

Departamento de Microbiología
Facultad de Biología



**Caracterización de los sistemas de Quorum Sensing en
rizobios. Importancia durante el diálogo molecular en la
simbiosis rizobio-leguminosa.**

Francisco Pérez Montaña
Sevilla, 2012

Departamento de Microbiología
Facultad de Biología



**Caracterización de los sistemas de Quorum Sensing en
rizobios. Importancia durante el diálogo molecular en la
simbiosis rizobio-leguminosa.**

**Memoria presentada por el Licenciado en Biología Francisco Pérez
Montaño para optar al grado de Doctor.**

Sevilla, 2012

Departamento de Microbiología
Facultad de Biología



LOS DIRECTORES DE LA TESIS

Fdo. Dra. Rosario Espuny Gómez y Dr. Ramón Bellogín Izquierdo
Profesores Titulares
Departamento de Microbiología
Universidad de Sevilla

Fdo. Francisco Pérez Montaña



Mi agradecimiento al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España y a la Universidad de Sevilla por haber hecho posible la realización de este trabajo.

*“Es imposible determinar simultáneamente y con exactitud,
la posición y la velocidad de un electrón”*

Principio de Incertidumbre

Werner Heisenberg

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a mis padres todos y cada uno de los segundos de su vida que me han dedicado y querido, ni eligiéndooos tendría unos padres mejores...

...en primer lugar, quiero agradecerle al ex Director del Departamento de Microbiología de la Universidad de Sevilla y, ahora, Decano de la Facultad de Biología, Dr. Antonio Torres, por permitirme hacer la Tesis en el Departamento. También reconocer al Ministerio de Ciencia e Innovación del Gobierno de España por financiar mi periodo predoctoral con la beca de Formación del Profesorado Universitario. Gracias al grupo del Profesor Gil Serrano, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, en especial a Rocío, Sergio y Miguel Ángel, porque sin vuestra ayuda no podría haber completado algunos de los estudios de esta Tesis.

A Charo y Ramón por ser, además de mis directores de Tesis, unos padres para mí en la ciencia y también, fuera de ella. Gracias por cuidarme tanto. Gracias Ollero, por ser como eres, porque aún en tus días menos buenos, alegras la vida; por tu amistad, por la ayuda y apoyo que siempre me has dado. También agradecer a tí, Javi, porque eres un ejemplo en todo lo que haces, en lo científico y en lo personal; por lo mucho que me has aportado y dado todos estos años. Gracias también a su mujer, Marina. Tengo que agradecer también a mi compañera de alegrías y de penas durante casi todo este tiempo, la Dra. Guasch, porque siempre ha estado apoyándome y comprendiéndome, aún sin decir nada. Gracias también Pablito, por tu entusiasmo y trabajo. Te deseo mucha suerte en lo personal y en lo profesional. Cynthia, espero que te vaya genial en esta etapa que ahora empiezas.

Especial agradecimiento también a Jose Mari, por toda la ayuda científica que me ha dado, y sobre todo por su amistad. Eres una persona admirable. A mi amigo Jou, porque ha sido un hermano para mí todo estos años; ojalá lo sigamos siendo siempre. A Chano, porque aunque seas casi el último en llegar, ya eres importante para mí y para la vida en el laboratorio. Creo que serás un gran científico. Al resto de miembros del L4, Teresa, Ana, José Enrique y especialmente a Isa, por la ayuda que en algún momento me habéis prestado.

A Paco, María, Marimar y Joaquín, porque aunque nuestro campo de investigación sea muy diferente, la cercanía y disposición que siempre habéis mostrado son de agradecer. A Serva y Cris por, además de lo ya dicho, pasar tan buenos ratos fuera del laboratorio. A Edu porque siempre me has ayudado en el laboratorio, incluso sin pedírtelo, y por

regalarme tu amistad fuera de él. A Puri, por tu dedicación en la organización de las PIM. Mención especial a los dos soles que hay en la cocina, Nuria y Rocío, porque ponéis cariño y alegría en todo lo que hacéis, incluido el aguantarme. Ilumináis el día a día en el laboratorio. A Inés, porque siempre solucionas todo con eficiencia y, sobre todo, con una sonrisa. También tengo que agradecer a todas las personas, Saida, Abi, Raquel, Flora, Ángeles y muchos más que seguro se me olvidan porque, aún no estando ya en el departamento, me han aportado cosas positivas durante estos años.

A Monre, por subirme el ánimo en todos esos momentos en los que apenas tenía, por confiar en mí como científico y por darme tu amistad. También gracias a todos los del fútbol de los lunes, porque durante tres o cuatro años nos hemos evadido de nuestros problemas juntos, y sin darnos cuenta, nos hemos hecho amigos. En especial a Joaquín, Marquiño y Jorge. A todos los aljibeños, Antonio, Camilo, Lucía, Isa, Cire, Clara, Rocío, Livia, porque da gusto conocer a gente tan sana, con tantas cosas en común y con la que te sientes tan a gusto.

Tengo también que agradecer a Karima, Marco y Regina en Nottingham, y Juan, Fran, Irene, Emma, Ana y Paola en Madrid, porque me hicieron sentir como en mi casa durante las dos estancias que he realizado durante la Tesis. Fuisteis mi familia, mis amigos y mis compañeros. Por supuesto, agradecer también a Miguel Cámara y Javi Lloret el permitirme trabajar y disfrutar en sus respectivos laboratorios durante esos meses.

Gracias María José.

Aunque cada día es más difícil coincidir y quedar, en lo que soy como biólogo y como persona tienen un enorme peso mis amigos de la facultad, Juan Carlos, Aída, Noelia, Cristina, Mariano, y sobre todo, mi gran amigo Leandro...y tu también Violeta. Y, aún no teniendo nada que ver en mi formación como investigador, o quizás sí, tengo que darle infinitas gracias a mis amigos de toda la vida, los del pueblo. Sois los mejores del mundo, cada uno con sus pequeños defectos y con sus enormes virtudes, Álvaro, Alex, Javi, Manolo Pascual, Manolo de Marca, Mariano, Antonio, Maxi, Jose Joaquín, José Mari, Luis, Juanfe, Paco Practicante, Chema, Migue de Sevilla, Maiky, Carmen Jurado,

Carmen Chía, Ana, Lola, Mari Carmen, Mariví, Elisa, Maria José, Leo...Gracias por existir y ser mis amigos.

A mi familia, mis abuelos Alfonso, Asunta, Domingo y Servanda; mis tías y abuelas Carmen y Encarna; mis tíos Isabel y Aurelio, Mari Ángeles y José Manuel, Isabel y Cristobal, Aurori y Paco; mis primos Ana, Luís, José Alfonso, Conchi, Rubén, Cristina y Paquito; y al nuevo miembro de mi familia, mi cuñado Baena. Gracias por todo el impagable e incondicional amor que me habéis dado durante toda mi vida. Y, aunque ya los he nombrado, quiero dedicar especialmente esta Tesis a mi tío José Manuel y sobre todo a mi tía Encarna, porque sé que se han sentido especialmente orgullosos de mí durante toda su vida.

Gracias a Mari, mi hermanita, por ser única y tan maravillosa. Sé que si tengo algo bueno es porque lo he aprendido de tí y de nuestros padres. Te mereces todo en la vida.

...

... y, sobre todo, a ti...mi Irene, porque aunque te podría agradecer que hayas sido mi amiga, mi compañera de laboratorio, la persona que me ha alegrado siempre y hecho que ame aún más este mundo de la ciencia, y que me sienta tan pleno en el día a día de este Departamento... prefiero agradecerte y sobre todo decirte que por fin sé que mi vida ha merecido la pena vivirla, que es única. Y es porque tú formas parte de ella. Te quiero.

ÍNDICES

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.- Comunicación celular: Quorum Sensing	3
1.2.- Mecanismos Moleculares del QS	5
1.2.1.- Autoinductores	5
1.2.1.1.- N-acil homoserina lactonas.....	6
1.2.1.2.- Autoinductor-2	8
1.2.1.3.- Dipéptidos cíclicos	9
1.2.1.4.- Bradyoxetina	10
1.2.1.5.- Alquil-quinolonas.....	11
1.2.1.6.- Otros tipos de AI	12
1.2.2.- Sintetas de autoinductores	13
1.2.2.1.- Sintetas de AHL	13
1.2.2.2.- Sintetas de AI-2.....	15
1.2.2.3.- Sintetas de otro tipos de AI.....	16
1.2.3.- Reguladores del Quorum Sensing.....	17
1.2.3.1- Reguladores de tipo LuxR.....	17
1.2.3.2.- Reguladores de tipo LuxP/Q	17
1.2.4.- Regulación negativa del Quorum Sensing	18
1.2.4.1.- Proteínas antiactivadoras	18
1.2.4.2.- Proteínas homólogas a los reguladores de tipo LuxR	19
1.2.4.3.- Enzimas que degradan la AHL.....	20
1.2.4.4.- Represión mediante ARNi.....	20
1.3.- Biosensores bacterianos de QS.....	21
1.3.1.- <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026.....	21
1.3.2.- <i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 (pZRL4)	22
1.3.3.- <i>Escherichia coli</i> JM109 (pSB536)	22
1.3.4.- Biosensores que expresan la enzima lactonasa	23
1.4.- Simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y leguminosas	23
1.4.1.- Bacterias fijadoras de nitrógeno	24
1.4.2.- Fases de la simbiosis	25
1.4.2.1.- Colonización de raíces y formación de biofilm.....	26
1.4.2.2.- La infección y el desarrollo del nódulo	28

1.4.2.3.- Fijación biológica de nitrógeno	31
1.4.3.- Bases moleculares de la interacción simbiótica	32
1.4.3.1.- Los flavonoides.....	33
1.4.3.2.- Los factores de nodulación	36
1.4.3.3.- Los polisacáridos de superficie.....	37
1.4.3.4.- El sistema de secreción de tipo III	37
1.5.- QS en bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno	38
1.5.1.- <i>Rhizobium leguminosarum</i>	40
1.5.1.1.- <i>cinI</i> y <i>cinR</i>	40
1.5.1.2.- <i>raiI</i> y <i>raiR</i>	42
1.5.1.3.- <i>rhiI</i> y <i>rhiR</i>	42
1.5.1.4.- <i>traI</i> y <i>traR</i>	42
1.5.1.5.- otros reguladores de tipo <i>luxR</i>	43
1.5.2.- <i>Rhizobium etli</i>	44
1.5.2.1.- <i>cinI</i> y <i>cinR</i>	44
1.5.2.2.- <i>raiI</i> y <i>raiR</i>	45
1.5.2.3.- <i>traI</i> y <i>traR</i>	46
1.5.3.- <i>Rhizobium</i> sp. NGR234.....	46
1.5.3.1.- <i>traI</i> y <i>traR</i>	47
1.5.3.2.- <i>ngrI</i> y <i>ngrR</i>	48
1.5.4.- <i>Sinorhizobium meliloti</i>	48
1.5.4.1.- <i>sinI</i> y <i>sinR</i>	48
1.5.4.2.- Sistema <i>mel</i>	49
1.5.4.3.- <i>traI</i> y <i>traR</i>	50
1.5.4.- <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	50
1.6.- Interferencia en los sistemas de QS bacteriano	50
1.6.1.- Furanonas halogenadas.....	51
1.6.2.- L-canavanina	52
1.6.3.- Opinas.....	52
1.6.4.- Flavonoides	53
1.6.5.- Hormonas humanas	54
1.6.6.- Otros que interfieren en los sistemas de QS	55
2.- OBJETIVOS.....	57

3.- MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1.- Bacterias, plásmidos y medios de cultivo	63
3.1.1.- Bacterias y plásmidos	63
3.1.2.- Medios de cultivo para <i>Sinorhizobium</i> , <i>Rhizobium</i> y <i>Agrobacterium</i>	66
3.1.3.- Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i> y <i>Chromobacterium violaceum</i> CV026.....	67
3.1.4.- Agentes selectivos e identificativos	68
3.1.5.- Flavonoides	68
3.1.6.- Medidas de pH y espectrofotométricas	69
3.1.7.- Solución de congelación.....	69
3.2.- Técnicas microbiológicas	69
3.2.1.- Métodos de transferencia de ADN entre bacterias	69
3.2.1.1.- Conjugación.....	69
3.2.1.2.- Transformación de <i>Escherichia coli</i>	70
3.2.2.- Determinación de la actividad β -galactosidasa	71
3.2.3.- Visualización de exopolisacáridos (EPS).....	73
3.2.4.- Estudio del lipopolisacárido (LPS).....	73
3.2.4.1.- Extracción del LPS	73
3.2.4.2.- Electroforesis del LPS	74
3.2.4.3.- Tinción del LPS	74
3.2.5.- Estudio de las proteínas extracelulares.....	75
3.2.5.1.- Extracción de las proteínas extracelulares.....	75
3.2.5.2.- Electroforesis de las proteínas	75
3.2.5.3.- Tinción de las proteínas con plata	76
3.2.6.- Estudios de la movilidad bacteriana	77
3.2.7.- Estudios de la formación de biofilm bacteriano	77
3.3.- Métodos de biología molecular	78
3.3.1.- Extracción de ADN genómico	78
3.3.2.- Extracción de ADN plasmídico.....	78
3.3.3.- Restricción del ADN	79
3.3.4.- Electroforesis del ADN	80
3.3.5.- Aislamiento del ADN de geles de agarosa	80
3.3.6.- Desfosforilación del ADN	80

3.3.7.- Conversión de extremos cohesivos en romos.....	81
3.3.8.- Ligación del ADN	81
3.3.9.- Amplificación del ADN por PCR	82
3.3.10.- Cuantificación de la expresión de genes mediante qPCR	82
3.3.11.- Hibridación ADN/ADN	84
3.3.11.1.- Transferencia del ADN a filtros de nylon.....	85
3.3.11.2.- Marcaje de la sonda	85
3.3.11.3.- Hibridación de la sonda al ADN del filtro.....	86
3.3.11.4.- Detección inmunológica	86
3.3.12.- Secuenciación del ADN	87
3.3.13.- Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas	88
3.3.14.- Análisis por qPCR	88
3.4.- Métodos utilizados para los estudios con las plantas	88
3.4.1.- Plantas	89
3.4.2.- Soluciones nutritivas para las plantas.....	89
3.4.3.- Desinfección y germinación de semillas	89
3.4.4.- Inoculación y cultivo de plantas	90
3.4.5.- Ensayos de nodulación y colonización.....	91
3.4.5.1.- Secado de la parte aérea de la planta	92
3.5.- Técnicas para el estudio de los sistemas de QS bacteriano	92
3.5.1.- Obtención de AI de los sobrenadantes de cultivos bacterianos.....	92
3.5.2.- Ensayos de detección de AI.....	92
3.5.3.- Extracción y separación de AI mediante cromatografía en capa fina (TLC)	
3.5.4.- Detección de AI en cromatoplasas	93
3.5.5.- Análisis por HPLC	93
3.5.4.1.- Separación y cuantificación de AI.....	93
3.5.4.2.- Determinación estructural de los AI mediante	
espectrometría de masas	94
3.6.- Técnicas para el estudio de la interferencia del QS bacteriano	95
3.6.1.- Obtención de material vegetal: exudados de semilla y raíces, extractos de semilla y raíces de plantas	95
3.6.2.-Ensayos para la detección de moléculas que interfieren	96
en el QS bacteriano	96
3.6.3.- Cromatografía en capa fina	97

3.6.4.- Análisis por HPLC	98
3.6.4.1.- Separación y cuantificación de moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano.....	98
3.6.4.2.- Determinación estructural de moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano mediante espectrometría de masas.....	98
3.7.- Técnicas microscópicas	100
3.7.1.- Microscopía confocal	101
3.7.2.- Microscopía de epifluorescencia	101
3.7.3.- Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	102
3.8.- Análisis estadístico	103
4.- RESULTADOS	105
4.1.- Caracterización de los sistemas de QS	108
4.1.1.- Detección y cinética de producción de AI.....	108
4.1.2.- Cromatografía en capa fina (TLC)	109
4.1.3.- Análisis estructural de los AI	110
4.1.4.- Detección, aislamiento y secuenciación de genes de síntesis de AI.....	121
4.1.5.- Mutación de los genes de síntesis de AI y del gen <i>nodDI</i> de <i>S. fredii</i> SMH12.....	123
4.1.5.1.- Mutagénesis dirigida de <i>traI</i> de <i>S. fredii</i> SMH12.....	125
4.1.5.2.- Mutagénesis dirigida de <i>nodDI</i> de <i>S. fredii</i> SMH12.....	127
4.1.5.3.- Mutagénesis dirigida de <i>rail</i> de <i>R. etli</i> ISP42.....	128
4.1.6.- Obtención de estirpes de rizobios defectivas en la producción de AHL....	132
4.1.7.- Determinación del AI sintetizado por cada gen de síntesis de AHL.....	134
4.2.- Influencia de los flavonoides e la producción global de AI y en la expresión de genes de síntesis de AI	138
4.2.1.- Efecto de distintos flavonoides sobre la expresión de genes de nodulación	138
4.2.2.- Influencia de flavonoides en la producción de AI.....	140
4.2.2.1.- Ensayos de difusión en placa.....	140
4.2.2.2.- Ensayos de actividad β -galactosidasa del biosensor NT1 (pZRL4) inducido con sobrenadantes bacterianos obtenidos en presencia y ausencia de flavonoides	142

4.2.2.3.- Análisis mediante TLC de los AI producidos por las estirpes en presencia y ausencia de los flavonoides inductores de los genes de nodulación.....	143
4.2.2.4.- Ensayos de actividad β -galactosidasa con fracciones obtenidas por HPLC	
4.2.2.5.- Análisis mediante espectrometría de masas	145
4.2.2.6.- Cuantificación mediante qPCR de la expresión de genes	149
de síntesis de AI	150
4.2.3.- Curvas de crecimiento	152
4.3.- Papel de los sistemas de QS en la simbiosis con la leguminosa	154
4.3.1.- Fenotipos simbióticos.....	154
4.3.2.- Influencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación sobre el gen <i>trnI</i> en diferentes fondos genéticos de SMH12	157
4.3.3.- Proteínas extracelulares	159
4.3.4.- Polisacáridos superficiales: Exopolisacáridos y Lipopolisacáridos	161
4.3.5.- Movilidad bacteriana tipo swimming.....	161
4.3.6.- Biofilm.....	165
4.3.6.1.- Estudio de la adhesión a superficies abióticas.....	165
4.3.6.2.- Estudios del desarrollo del biofilm mediante microscopía confocal ...	166
4.3.7.- Estudios de la colonización de raíces mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido.....	169
4.3.8.- Curvas de crecimiento	172
4.4.- Interferencia en los sistemas de QS bacteriano	178
4.4.1.- Detección en plantas de arroz y judía de moléculas que interfieren en el QS bacteriano	178
4.4.1.1.- Ensayos con exudados de semilla, exudados de raíz y extractos de semilla.....	178
4.4.1.2.- Ensayos con raíces de plantas.....	180
4.4.2.- Determinación de las moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano.....	183
4.4.2.1.- Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC)	183
4.4.3.- Caracterización química de las moléculas que interfieren con los sistemas de QS bacteriano.....	184
4.4.3.1.- Influencia del pH	184
4.4.3.2.- Ensayos con biosensores que expresan la enzima lactonasa	184

4.4.3.3.- Análisis mediante cromatografía en capa fina y revelado con biosensores portadores del gen de la lactonasa	188
4.4.3.4.- Análisis mediante HPLC y ensayo biológico con el biosensor portador del gen de la lactonasa de las fracciones obtenidas de los extractos de semillas de plantas	189
4.4.3.5.- Análisis estructural de las moléculas que interfieren en los sistemas de QS	192
5.- DISCUSIÓN	195
6.- CONCLUSIONES.....	229
7.- BIBLIOGRAFÍA.....	233

ÍNDICE DE TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Tipos de <i>N</i> -acil homoserina lactonas.....	7
Tabla 1.2. Ejemplos de especificidad en la nodulación de diferentes rizobios	25
Tabla 1.3. Rizobios conocidos hasta la fecha.....	28
Tabla 1.4. Estructura química de algunos flavonoides utilizados en esta Tesis.....	34
Tabla 1.5. Algunos sistemas de QS en bacterias de la familia <i>Rhizobiaceae</i>	39

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Bacterias y plásmidos utilizados	63
Tabla 3.2. Cebadores utilizados en experimentos de amplificación del ADN por PCR.....	83
Tabla 3.3. Cebadores utilizados en experimentos de cuantificación de la expresión de genes mediante qPCR.....	85

RESULTADOS

Tabla 4.1. Iones seleccionados en Q1 y Q3 usados en espectrometría de masas en tándem (mediante MRM) para la detección de las diferentes AHL	112
Tabla 4.2. Tiempos de retención y fracción aproximada para diferentes AHL patrones tras su paso por HPLC	119
Tabla 4.3. Genes de síntesis de AI detectados por PCR en <i>S. fredii</i> SMH12, <i>R. etli</i> ISP42 y <i>R. sultae</i> IS123	122
Tabla 4.4. Expresión del gen <i>nodA</i> en presencia de diferentes flavonoides.....	139
Tabla 4.5. Actividad β -galactosidasa obtenida con el biosensor <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) crecido en presencia de diferentes sobrenadantes bacterianos.....	144
Tabla 4.6. Tiempos de retención y fracción aproximada de las diferentes AHL patrones tras su separación por HPLC	147
Tabla 4.7. AHL detectadas mediante HPLC-MS/MS	150
Tabla 4.8. Respuestas de diferentes estirpes biosensoras a compuestos producidos por plantas de arroz y judía.....	182

DISCUSIÓN

Tabla 5.1. Resumen de los genes de síntesis de AHL detectados en las tres estirpes de estudio y las AHL que producen.	204
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Modelo de quorum sensing en <i>V. fischeri</i>	4
Figura 1.2. Estructura de las <i>N</i> -acil-homoserina lactona.....	6
Figura 1.3. Ruta de síntesis del AI-2.	9
Figura 1.4. Estructura de los dipéptidos cíclicos.....	10
Figura 1.5. Estructura de la bradyoxetina.....	11
Figura 1.6. Estructura química de las alquil-quinolonas.....	11
Figura 1.7. Estructura química de otros AI.....	12
Figura 1.8. Estructura química de la <i>p</i> -coumaroil-HSL.....	13
Figura 1.9. Estructura de la isovaleril-homoserina lactona.....	13
Figura 1.10. Reacción catalizada por proteínas de la familia LuxI.....	14
Figura 1.11. Biosíntesis del precursor del AI-2.....	16
Figura 1.12. Ensayos de difusión en placa con biosensores bacterianos.....	23
Figura 1.13. Modelo general de formación de biofilm.....	29
Figura 1.14. Tipos de nódulos.....	31
Figura 1.15. Estructura de los factores de nodulación.....	36
Figura 1.16. Sistemas de QS en <i>R. leguminosarum</i> bv <i>viciae</i>	41
Figura 1.17. Sistemas de QS en <i>R. etli</i>	45
Figura 1.18. Sistemas de QS en <i>Rhizobium</i> sp. NGR234.....	47
Figura 1.19. Sistemas de QS en <i>Sinorhizobium meliloti</i>	49
Figura 1.20. Estructura química de las furanonas halogenadas.....	51
Figura 1.21. Estructura química de la γ -canavanina.....	52
Figura 1.22. Estructura química de las opinas.....	53
Figura 1.23. Estructura química de la flavan-3-ol catequina.....	54
Figura 1.24. Estructura química de la adrenalina y noradrenila.....	55
Figura 1.25. Estructura química de la patulina.....	56

RESULTADOS

Figura 4.1. Detección y cinética de producción de AI.	109
Figura 4.2. Cromatografía en capa fina de los extractos de las tres estirpes silvestres de rizobios.....	110

Figura 4.3. Cromatograma MRM de los AI aislados de SMH12.....	113
Figura 4.4. EPI del pico cromatográfico de SMH12 a los 17,48 minutos.....	113
Figura 4.5. EPI del pico cromatográfico de SMH12 a los 26,13 minutos.....	114
Figura 4.6. Cromatograma MRM de los AI aislados de ISP42.....	114
Figura 4.7. EPI del pico cromatográfico de ISP42 a los 26,84 minutos.....	115
Figura 4.8. EPI del pico cromatográfico de ISP42 a los 19,75 minutos.....	115
Figura 4.9. EPI del pico cromatográfico de ISP42 a los 33,44 minutos.....	116
Figura 4.10. Cromatograma MRM de los AI aislados de IS123.....	116
Figura 4.11. EPI del pico cromatográfico de IS123 a los 18,45 minutos (A).	117
Figura 4.12. EPI del pico cromatográfico de IS123 a los 18,45 minutos (B).	117
Figura 4.13. EPI del pico cromatográfico de IS123 a los 26,74 minutos.....	118
Figura 4.14. Ensayos de actividad β -galactosidasa de fracciones obtenidas por HPLC de extractos de sobrenadantes bacterianos.	120
Figura 4.15. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de síntesis de AI.	123
Figura 4.16. Esquema de mutagénesis in vitro del gen <i>traI</i> de SMH12.....	126
Figura 4.17. Comprobación mediante hibridación de la construcción del mutante <i>traI</i> de SMH12 (SVQ646).....	127
Figura 4.18. Comprobación mediante hibridación de la construcción del mutante <i>nodDI</i> de SMH12(SVQ648).....	128
Figura 4.19. Cromatografía en capa fina de los extractos de SMH12 y los mutantes <i>traI</i> y <i>nodDI</i>	129
Figura 4.20. Esquema de mutagénesis in vitro del gen <i>rail</i> de ISP42.....	130
Figura 4.21. Comprobación mediante hibridación de la construcción del mutante <i>rail</i> de ISP42(SVQ664).....	131
Figura 4.22. Cromatografía en capa fina de los extractos de ISP42 y el mutante <i>rail</i>	131
Figura 4.23. Cromatografía en capa fina de los extractos de SMH12 y SMH12 (pME6863)	133
Figura 4.24. Cromatografía en capa fina de los extractos de ISP42 e ISP42 (pME6863).....	134
Figura 4.25. Esquema de la construcción de plásmidos de expresión de los genes de síntesis de AI.	136

Figura 4.26. Cromatografía en capa fina de los extractos de estirpes que expresan los genes de síntesis de AI.	137
Figura 4.27. Expresión del gen <i>nodA</i> en las estirpes <i>S. fredii</i> SMH12, <i>R. etli</i> ISP42 y <i>R. sultae</i> IS123 en presencia de diferentes flavonoides.	140
Figura 4.28. Ensayos de difusión en placas de Petri usando al biosensor <i>A. tumefaciens</i> NT1(pZRL4) para el estudio de la influencia de los flavonoides sobre la producción de AI.	141
Figura 4.29. Ensayos de difusión en placas de Petri con AHL patrones usando al biosensor <i>A. tumefaciens</i> NT1(pZRL4).	142
Figura 4.30. Separación y revelado mediante TLC de AI de cultivos crecidos con o sin flavonoides.	146
Figura 4.31. Ensayos de actividad β -galactosidasa de fracciones obtenidas por HPLC de extractos de sobrenadantes bacterianos.	148
Figura 4.32. Cromatograma MRM de los AI aislados de SMH12 crecidos en presencia de genisteína.	149
Figura 4.33. Análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión de los genes de síntesis de AI de <i>S. fredii</i> SMH12 (<i>traI</i>) y <i>R. etli</i> (<i>rail</i> y <i>cinI</i>).	151
Figura 4.34. Efecto de los flavonoides inductores de los genes de nodulación sobre el crecimiento bacteriano.	153
Figura 4.35. Número de nódulos de SMH12, SVQ646, SVQ648 y SMH12 (pME6863) en la simbiosis con soja cv. Osumi.	155
Figura 4.36. Peso fresco de los nódulos y peso seco de la parte aérea de SMH12, SVQ646, SVQ648 y SMH12 (pME6863) en la simbiosis con soja cv. Osumi.	156
Figura 4.37. Número de nódulos de ISP42, SVQ664 y ISP42 (pME6863) en la simbiosis con judía cv. BBL.	156
Figura 4.38. Peso fresco de los nódulos y Peso seco de la parte aérea de ISP42, SVQ664 y ISP42 (pME6863) en la simbiosis con judía cv. BBL.	157
Figura 4.39. Análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión del gen <i>traI</i> en en SMH12, nodD1 (SVQ648) y el portador del gen de la lactonasa [SMH12 (pME6863)].	159
Figura 4.40. Perfil de proteínas extracelulares de <i>S. fredii</i> SMH12 y de derivados deficientes en QS.	160
Figura 4.41. Producción de EPS y perfil de LPS de <i>S. fredii</i> SMH12 y del derivado que expresa la enzima lactonasa.	162

Figura 4.42. Seguimiento de la movilidad tipo swimming.	163
Figura 4.43. Movilidad tipo swimming a los 7 días.	164
Figura 4.44. Adhesión relativa de las diferentes estirpes derivadas de SMH12 a placas microtítulo de poliestireno tras 6 días de cultivo.	165
Figura 4.45. Formación de biofilm a los 4 días al microscopio confocal.	167
Figura 4.46. Formación de biofilm a los 7 días al microscopio confocal.	168
Figura 4.47. Imágenes al microscopio de epifluorescencia de la colonización de raíces de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios.	170
Figura 4.48. Imágenes al microscopio electrónico de barrido de la colonización del tronco de la raíz de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios.	171
Figura 4.49. Visualización al microscopio electrónico de barrido de la colonización del ápice de la raíz de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios.	172
Figura 4.50. Imágenes al microscopio electrónico de barrido de la colonización de las raíces laterales de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios.	173
Figura 4.51. Curva de crecimiento de SMH12 y derivados en medio YM(3)	174
Figura 4.52. Ensayos de difusión en placa de exudados de semilla (ES) y exudados de raíz (ER) de plantas de arroz (A) cv Puntal y judía cv BBL (J).	179
Figura 4.53. Ensayos de difusión en placa de extractos de semillas (EX) de plantas de arroz (A) cv Puntal y judía cv BBL (J).	180
Figura 4.54. Ensayos en placa con raíces de plantas de arroz cv Puntal y de judía cv BBL en presencia de los diferentes biosensores.	181
Figura 4.55. Separación mediante TLC y revelado de moléculas que IQS.	183
Figura 4.56. Ensayos de difusión en placa de EX de plantas de arroz cv Puntal y judía cv BBL tras tratamiento alcalino.	185
Figura 4.57. Ensayos de difusión en placa con biosensores portadores del gen de la lactonasa.	186
Figura 4.58. Ensayos en placa con raíces de plantas de arroz cv Puntal y judía cv BBL en presencia de biosensores expresando la enzima lactonasa.	187
Figura 4.59. Separación y revelado de moléculas que IQS.	188
Figura 4.60. Ensayos de inducción de <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) y <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) (pME6863) con fracciones de extractos de semillas de arroz.	190
Figura 4.61. Ensayos de inducción de <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) y <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) (pME6863) con fracciones de extractos de semillas de judía.	191

Figura 4.62. Ensayos de inducción de <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) y <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) (pME6863) con diferentes concentraciones del patrón.....	191
Figura 4.63. Ensayos de inducción de <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) y <i>A. tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) (pME6863) en placas microtítulo.. ..	192

DISCUSIÓN

Figura 5.1. Principales señales moleculares durante la simbiosis.	206
Figura 5.2. Modelo de interferencia en los sistemas de QS bacteriano a través de exudados radicales.	211
Figura 5.3. Hipótesis de activación de los sistemas de QS en <i>S. fredii</i> SMH12.	215
Figura 5.4. Modelo de comunicación celular en la rizosfera.....	226

INTRODUCCIÓN

1.1.- Comunicación celular: Quorum Sensing

En 1970, Kenneth H. Nealson y John W. Hastings, de la Universidad de Harvard, observaron que una bacteria, *Vibrio fischeri*, presentaba dos comportamientos diferentes según fuese la densidad de su población, de tal forma que esta bacteria producía bioluminiscencia únicamente a altas densidades celulares (Nealson y Hastings, 1970). Basados en esta observación, postularon que la bioluminiscencia desarrollada por estos microorganismos posiblemente se debía a unos mensajeros moleculares que viajaban entre las células. Llamaron a estos mensajeros “autoinductores” (AI), ya que los sobrenadantes de los propios cultivos disparaban la transcripción de los genes implicados en la bioluminiscencia. Investigaciones posteriores dieron la razón a esta hipótesis, y once años más tarde se identificó por primera vez la naturaleza molecular del autoinductor de *V. fischeri*, era una *N*-acil-homoserina lactona (AHL) (Eberhard *et al*, 1981).

Pero *V. fischeri* no es la única bacteria capaz de percibir la densidad de su población y llevar a cabo una respuesta conjunta. En general, los microorganismos perciben las condiciones ambientales que les rodean y se comunican entre ellos mediante compuestos químicos, los autoinductores, que son difusibles, permeables a través de la membrana celular y se liberan al medio. Conforme aumenta la densidad celular de la población, el autoinductor se acumula hasta que, al alcanzar una concentración determinada, se incorpora de nuevo al interior de la célula. Ya dentro de la célula, interacciona con proteínas activadoras de la transcripción que, a su vez, inducen la expresión de los genes específicos que regulan. Este mecanismo permite a los microorganismos coordinar su comportamiento ya que, debido a los cambios continuos que se producen en el medio, necesitan reaccionar de manera rápida para adaptarse a estos cambios y sobrevivir. Al sistema de comunicación célula-célula que emplea AI producidos en respuesta a la densidad celular de la población de microorganismos se le denomina “Quorum Sensing” (QS).

Vibrio fischeri es una bacteria Gram-negativa que vive como simbiote en algunas especies animales marinas. En esta relación, el hospedador provee nutrientes a la bacteria y la bacteria, a cambio, genera luz que sirve al pez para atraer presas, alejar depredadores u otras actividades. Engebrecht y Silverman (1984 y 1987) demostraron que se necesitan dos componentes reguladores para dirigir el proceso de

bioluminiscencia en *V. fischeri*, estos componentes son LuxI, que cataliza la producción del AI y LuxR, un regulador transcripcional que, al unirse al AI, forma un dímero junto a otro elemento LuxR-AHL y activa el operón *lux*, que posee los genes que codifican la luciferasa. Además, una de las características más importantes del QS es que el gen de síntesis de AI (*luxI*) es uno de los genes que aumenta su expresión en presencia de AI. Esto genera una retroalimentación positiva que permite una rápida generación de bioluminiscencia.

Por otro lado, LuxR está regulada a nivel transcripcional mediante una proteína receptora de AMPc (CRP) (Dunlap y Greenberg, 1995) y, presumiblemente, a nivel post-transcripcional por GroEL (Dolan y Greenberg, 1992). A bajos niveles de AI, *luxR* está expresándose, sin embargo, a altas concentraciones de AHL, la propia proteína LuxR reprime su expresión (Figura 1.1).

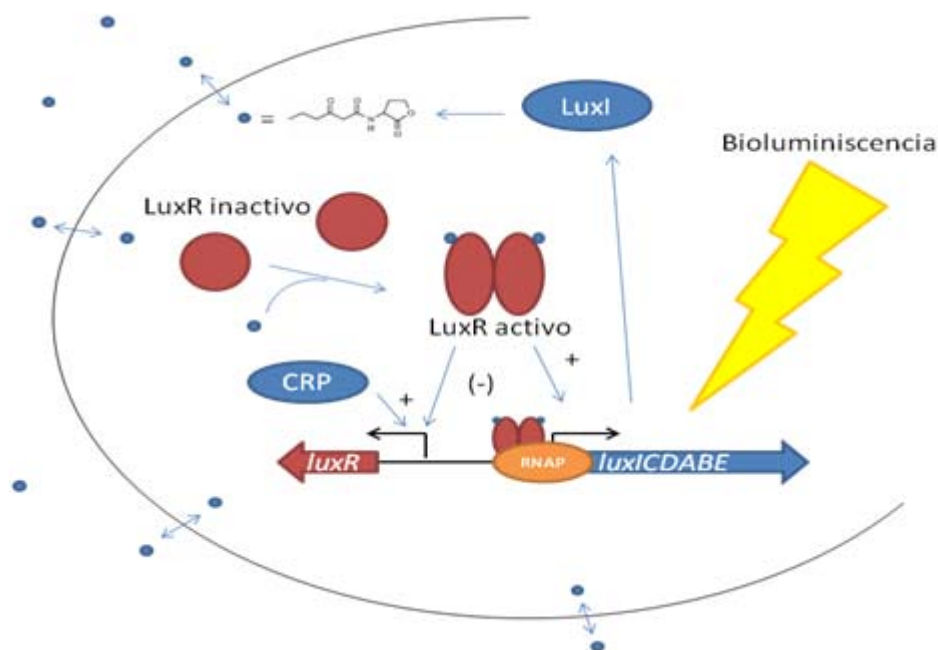


Figura 1.1. Modelo de quorum sensing en *V. fischeri*. A bajas densidades celulares, la transcripción del operón *luxICDABE* es basal, de tal forma que la expresión del gen *luxI*, que codifica una AHL sintasa, así como la producción de AHL es basal. La alta densidad celular implica una acumulación de AHL, que se une y activa al regulador transcripcional LuxR. LuxR activo se une al promotor del operón y recluta a la ARN polimerasa (RNAP), con lo que la expresión del operón *luxICDABE* se estimula. La expresión del gen *luxR* está regulada por varias vías, por la proteína receptora de AMPc (CRP), o a altas densidades celulares por la propia proteína LuxR.

Los sistemas de QS también están presentes en las bacterias Gram-positivas, si bien están menos estudiados. En estos microorganismos, las moléculas AI son, por lo general, oligopéptidos modificados que, al entrar en la célula, generan una cascada de fosforilaciones que finalizan con el incremento en la transcripción de una serie de genes diana (Reading y Sperandio, 2006).

En cualquier caso, ya sea en Gram-positivas o Gram-negativas, los sistemas de regulación dependientes de QS están implicados en el control de funciones de comportamiento o fisiológicas muy diversas, entre ellas, la bioluminiscencia, la transferencia de plásmidos por conjugación, la producción de antibióticos y bacteriocinas, la expresión de factores de virulencia, la formación de biopelículas, la motilidad, la producción de polisacárido, etc. Todas estas funciones tienen en común que sólo se ejecutan si el número de células de la población del microorganismo es lo suficientemente alto como para asegurar el éxito del proceso (Fuqua *et al.* 1994).

En esta Tesis, se estudian diferentes aspectos de los sistemas de QS presentes en tres estirpes de rizobios: *S. fredii* SMH12, *R. etli* ISP42 y *R. sullae* IS123 (bacterias Gram-negativas). Es por ello, por lo que la introducción se centrará en la descripción general de los sistemas de QS de bacterias Gram-negativas descubiertos hasta la fecha, poniendo especial énfasis en los sistemas de QS presentes en los rizobios.

1.2.- Mecanismos moleculares del QS

1.2.1.- Autoinductores

Los autoinductores son pequeñas moléculas que difunden libremente a través de la membrana celular bacteriana (aunque a veces pueden ser transportadas activamente) hacia el exterior celular (Aendekerk *et al.*, 2002). Cuando la concentración extracelular alcanza un umbral, estos AI vuelven a entrar en la célula y se unen a reguladores transcripcionales que se activan y regulan la expresión de una serie de genes (Alt-Mörbe *et al.*, 1996). En las bacterias Gram-negativas, los AI más comunes y numerosos son las *N*-acil-homoserina lactonas, aunque existen otros tipos de AI, como el AI-2, la bradyoxetina, los dipéptidos cíclicos, etc (González y Keshavan, 2006).

1.2.1.1.- *N*-acil-homoserina lactonas

En la mayoría de las bacterias Gram-negativas caracterizadas hasta la fecha, los mecanismos de QS son similares a los descritos para *V. fischeri*, difiriendo en los genes que son activados por estos sistemas. Es por ello por lo que el grupo más importante de AI son las AHL. Estas moléculas constan de un grupo conservado común a todas ellas, el anillo lactónico (HSL) unido a una cadena lateral variable de tipo acilo (Figura 1.2.).

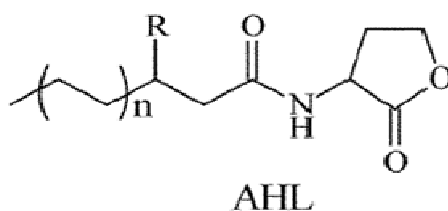


Figura 1.2. Estructura de las *N*-acil-homoserina lactona. Todas las AHL poseen un anillo lactónico común. Es la cadena lateral de tipo acilo la que determina la especificidad y variabilidad de las AHL. Pueden variar en la longitud de la cadena (n) o en la presencia o ausencia de sustituyente en el carbono 3 (R), que puede ser de tipo oxo- o hidroxil-.

Según la longitud de la cadena acilo lateral, las AHL se pueden clasificar de manera general en AHL de cadena corta (entre 4 y 8 carbonos en la cadena lateral) y AHL de cadena larga (entre 10 y 18 carbonos). Además de la longitud de la cadena lateral, el grado de saturación de la misma es lo que da la variabilidad y la especificidad dentro de las AHL, de tal forma que el carbono de la posición 3 puede aparecer reducido, poseer un grupo oxo o un grupo hidroxilo (Tabla 1.1.) (Leadbetter y Greenberg, 2000) (Pellock *et al.*, 2002).

La estructura química de las AHL las hace moléculas anfipáticas, ya que la cadena acilo tiene hidrofobicidad y el anillo lactónico (HSL) proporciona hidrofilia. Esta característica permite a las AHL difundir libremente a través de la membrana anfipática celular (aunque en las AHL de cadena larga el paso a través de la membrana puede estar potenciado por proteínas transportadoras (Pearson *et al.*, 1999)), pero también estar libremente en el medio extracelular o dentro del citoplasma celular (Fuqua *et al.*, 2001). Así pues, la longitud y el grado de saturación de la cadena lateral determinan la variabilidad y especificidad de estos AI. Para mayor complejidad, la mayoría de los

microorganismos no producen un único tipo de AHL y diferentes microorganismos pueden producir la misma AHL (Hardman *et al.*, 1998).

Tabla 1.1. Tipos de *N*-acil-homoserina lactonas.

Compuesto químico	Nº de C	C3	Abreviatura
<i>N</i> -butiril-homoserina lactona	4C	-	C4-HSL
<i>N</i> -hexanoil-homoserina lactona	6C	-	C6-HSL
<i>N</i> -octanoil-homoserina lactona	8C	-	C8-HSL
<i>N</i> -decanoil-homoserina lactona	10C	-	C10-HSL
<i>N</i> -dodecanoil-homoserina lactona	12C	-	C12-HSL
<i>N</i> -tetradecanoil-homoserina lactona	14C	-	C14-HSL
<i>N</i> -hexadecanoil-homoserina lactona	16C	-	C16-HSL
<i>N</i> -octodecanoil-homoserina lactona	18C	-	C18-HSL
<i>N</i> -(3-oxo-hexanoil)-homoserina lactona	6C	oxo	3-oxo-C6-HSL
<i>N</i> -(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona	8C	oxo	3-oxo-C8-HSL
<i>N</i> -(3-oxo-decanoil)-homoserina lactona	10C	oxo	3-oxo-C10-HSL
<i>N</i> -(3-oxo-dodecanoil)-homoserina lactona	12C	oxo	3-oxo-C12-HSL
<i>N</i> -(3-oxo-tetradecanoil)-homoserina lactona	14C	oxo	3-oxo-C14-HSL
<i>N</i> -(3-oxo-hexadecanoil)-homoserina lactona	16C	oxo	3-oxo-C16-HSL
<i>N</i> -(3-oxo-octodecanoil)-homoserina lactona	18C	oxo	3-oxo-C18-HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-butiril)-homoserina lactona	4C	hidroxilo	3-OH-C4-HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-hexanoil)-homoserina lactona	6C	hidroxilo	3-OH-C6-HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-octanoil)-homoserina lactona	8C	hidroxilo	3-OH-C8-HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-decanoil)-homoserina lactona	10C	hidroxilo	3-OH-C10- HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-dodecanoil)-homoserina lactona	12C	hidroxilo	3-OH-C12- HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-tetradecanoil)-homoserina lactona	14C	hidroxilo	3-OH-C14- HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-hexadecanoil)-homoserina lactona	16C	hidroxilo	3-OH-C16- HSL
<i>N</i> -(3-hidroxi-octodecanoil)-homoserina lactona	18C	hidroxilo	3-OH-C18- HSL

Nº de C: número de carbonos de la cadena lateral acilo.

C3: sustituyente en el carbono 3.

Recientemente, Thiel *et al.*, (2009) demostraron que en dos bacterias, *Aeromonas culicicola* y *Jannaschia helgolandensis*, se producen AHL modificadas en las que la cadena acilo porta un grupo metilo, de tal forma que estos tipos de AHL poseen

números impares de carbonos en la cadena lateral. Así pues, en la estirpe *A. culicicola* 3249, además de algunas AHL comunes, se han identificado en sobrenadantes de cultivos bacterianos la *N*-isoheptanoil-homoserina lactona, la *N*-(3-hidroxi-isoheptanoil)-homoserina lactona, la *N*-isononanoil-homoserina lactona y *N*-(3-hidroxi-isononanoil)-homoserina lactona.

1.2.1.2.- Autoinductor-2

El autoinductor-2 fue identificado por primera vez como molécula señal del QS en *Vibrio harveyi* por Bassler *et al.* (1993). Desde entonces, este tipo de señal se ha descubierto en otras muchas bacterias Gram-negativas, tales como *Salmonella* spp., *Erwinia* spp., *Escherichia* spp. El AI-2 es una molécula de señalización interespecífica, que se ha descubierto incluso en bacterias Gram-positivas (Bassler, 1999; 2002).

Las funciones reguladas mediante este tipo de AI son varias, entre las que se encuentra la producción de bioluminiscencia en *V. harveyi* (Bassler *et al.*, 1994), la secreción de proteínas a través del sistema de secreción de tipo III en *E. coli* O157:H7 (Sperandio *et al.*, 1999), la producción del factor de virulencia VirB en *Shigella flexneri* (Day y Maurelli, 2001), etc. Además, la formación de biofilm dentales mixtos requiere de la producción del AI-2, lo cual refuerza la hipótesis de que estos AI actúan como moléculas de señalización interespecífica (Li *et al.*, 2002) (McNab *et al.*, 2003).

La estructura química del AI-2 de *V. fischeri* es un furanosil borato diéster, formado por dos anillos fusionados que contienen un átomo de boro formando el enlace diéster: (2*S*,4*S*)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetrahidrofurano-borato (Chen *et al.*, 2002). En *Salmonella* entérica serovar *Typhimurium* es un (2*R*, 4*S*)-2-metil-2,3,3,4-tetrahidroxitetra hidrofurano, en el que no aparece el boro. A pesar de ser dos moléculas diferentes, ambas especies pueden reconocer los dos tipos de AI-2, ya que provienen del mismo precursor, la 4,5-dihidroxil-2,3-pentanodiona (Miller *et al.*, 2004) (Figura 1.3.).

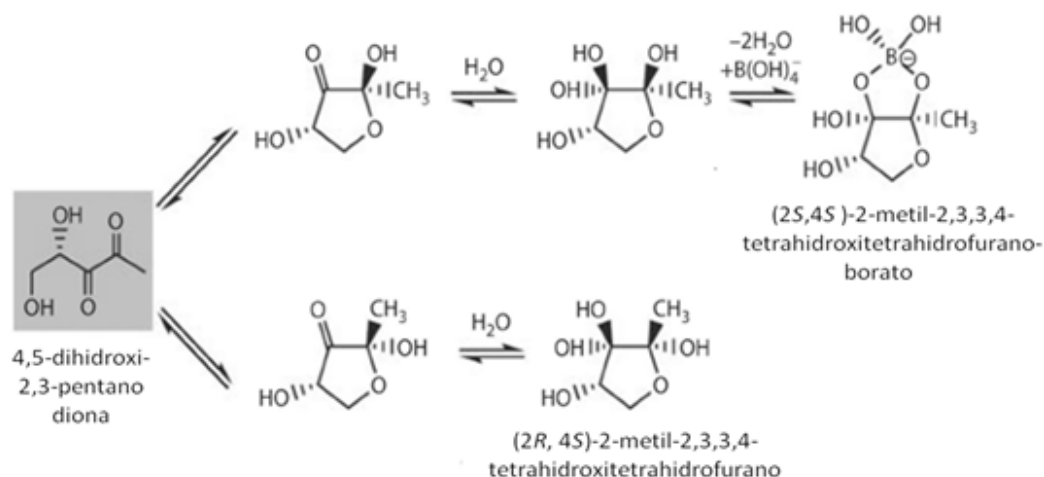


Figura 1.3. Ruta de síntesis del AI-2. Tanto el AI-2 de *V. fischeri* (superior) como el de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium (inferior) provienen del mismo precursor, la 4,5-dihidroxil-2,3-pentanodiona.

1.2.1.3.- Dipéptidos cíclicos

En *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el empleo de biosensores bacterianos, se descubrieron nuevos tipos de AI, los dipéptidos cíclicos. El análisis estructural de estas moléculas indicó que eran las dicetopiperazinas (DKP) ciclo (Δ -Ala-L-Val) y ciclo (L-Pro-L-Tyr) (Figura 1.4.). Este tipo de compuestos fue encontrado también en sobrenadantes de cultivos de *Pseudomonas fluorescens* y *P. alkaligenes*, en los que las moléculas encontradas eran de un tercer tipo de DKP, ciclo (L-Phe-L-Pro). Además, la DKP ciclo (Δ -Ala-L-Val) fue encontrada en sobrenadantes de cultivos de *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii* y *Enterobacter agglomerans* (Campbell *et al*, 2011). A pesar de su detección mediante biosensores basados en la proteínas de tipo LuxR, la concentración de DKP requerida para activarlos es muy superior a la que se requiere en el caso de AHL, por lo que su actividad biológica en el medio natural *per se* probablemente no sea importante. Sin embargo, se ha demostrado, que puede competir con ciertas AHL en su unión al elemento regulador LuxR, inhibiendo la expresión de genes regulados mediante QS. Pero no sólo tiene papel antagonista de las AHL, sino también agonista, ya que es capaz de incrementar la producción de violaceína en el biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026. La capacidad de los dipéptidos cíclicos de interferir en los sistemas de QS de otras especies añade aún más complejidad y

diversidad al lenguaje bacteriano basado en QS en el medio natural (Holden *et al.*, 1999).

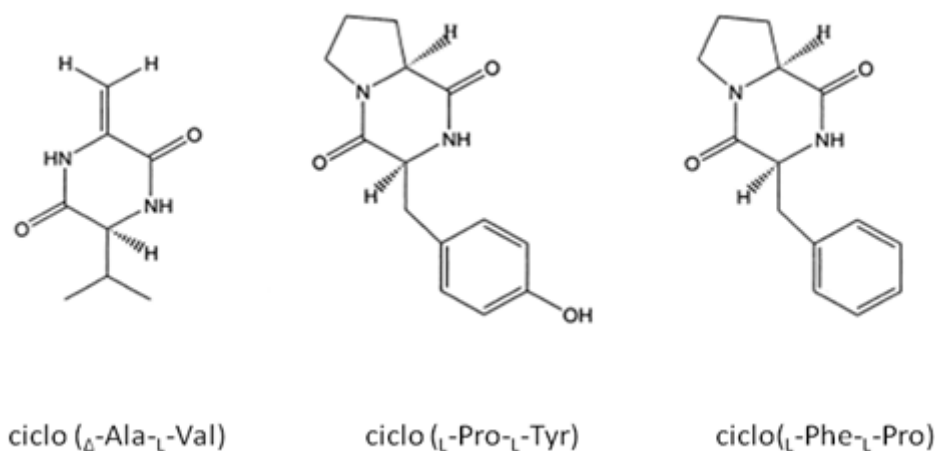


Figura 1.4. Estructura de los dipéptidos cíclicos. Estructura de los tres dipéptidos cíclicos descubiertos. Son diketopiperazinas (DKP) constituidas por parejas de aminoácidos.

1.2.1.4.- Bradyoxetina

La bradyoxetina es un regulador dependiente de densidad celular implicado en la represión de los genes *nod* a altas densidades celulares en *Bradyrhizobium japonicum*, una bacteria Gram-negativa fijadora de nitrógeno, simbionte de muchas leguminosas (Jitacksorn y Sadowsky, 2008). La estructura química propuesta de este factor dependiente de densidad celular es 2-{4-[[4-(3aminooxetano-2-il)fenil](imino) methyl]fenil}oxetano-3-il amino (Figura 1.5.). Debido a la complejidad del nombre químico, a esta molécula se le ha llamado bradyoxetina. La síntesis de este AI está relacionada con las concentraciones de Fe^{3+} en el medio, siendo potenciada su producción bajo déficit nutricional de este ión. De hecho, la estructura química propuesta de la bradyoxetina se asemeja a la de un sideróforo, el ácido mugeneico. Estudios preliminares llevados a cabo en otras especies de rizobios y en otras α -proteobacterias parecen indicar la presencia de este AI en los sobrenadantes de cultivos de estas bacterias (Loh *et al.*, 2002a).

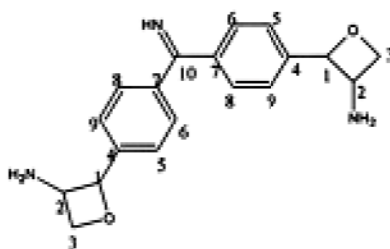


Figura 1.5. Estructura de la bradyoxetina. Estructura química de la 2-{4-[[4-(3aminooxetano-2-il)fenil](imino) methyl]fenil}oxetano-3-il amino, renombrada como bradyoxetina.

1.2.1.5.- Alquil-quinolonas

Pseudomonas aeruginosa produce otro tipo de molécula señal de tipo AI, la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, que ha sido llamada PQS. La PQS (“*Pseudomonas Quinolone Signal*”) pertenece a la familia de las 2-alkil-4-quinolonas (AQ) de la que se ha descrito que tienen propiedades antimicrobianas. Este AI está sintetizado a través de un operón que codifica una serie de proteínas implicadas en la síntesis de múltiples AQ, entre las que se incluye la 2-heptil-4-quinolona (HHQ), el precursor inmediato de la PQS, y que parece tener la capacidad de quelar hierro (Figura 1.6.). Los sistemas de QS basados en la PQS juegan un papel importante en la patogénesis de *P.aeruginosa*, ya que regula la producción de diversos factores de virulencia entre ellos, la síntesis de elastasa, de pirocianina o de la lectina LecA, además de regular la producción de biofilm bacteriano, básico para la colonización del hospedador. Al menos dos especies del género *Burkholderia*, *B. pseudomallei* y *B. thailandensis*, así como *P. putida* poseen el operón de síntesis de AQ, así como PQS y HHQ en los sobrenadantes de sus cultivos (Dubern and Diggle, 2008).

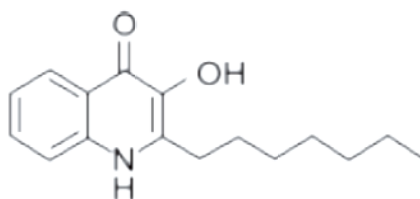


Figura 1.6. Estructura química de las alquil-quinolonas. Estructura química de la 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS).

1.2.1.6.- Otros tipos de AI

Existen otros AI menos frecuentes o estudiados dentro de las bacterias Gram-negativas, pero que también tienen la capacidad de regular y coordinar la expresión de genes en función de la densidad celular. La mayoría de estos AI están implicados en la producción de factores de virulencia. Son el éster etílico del ácido hidroxipalmítico (PAME) de *Ralstonia solanacearum*, el ácido metildodecanoico (DFS) de *Xanthomonas campestris* o el ácido farnesoico de *Candida albicans* (Gonzalez y Keshavan, 2006) (Figura 1.7).

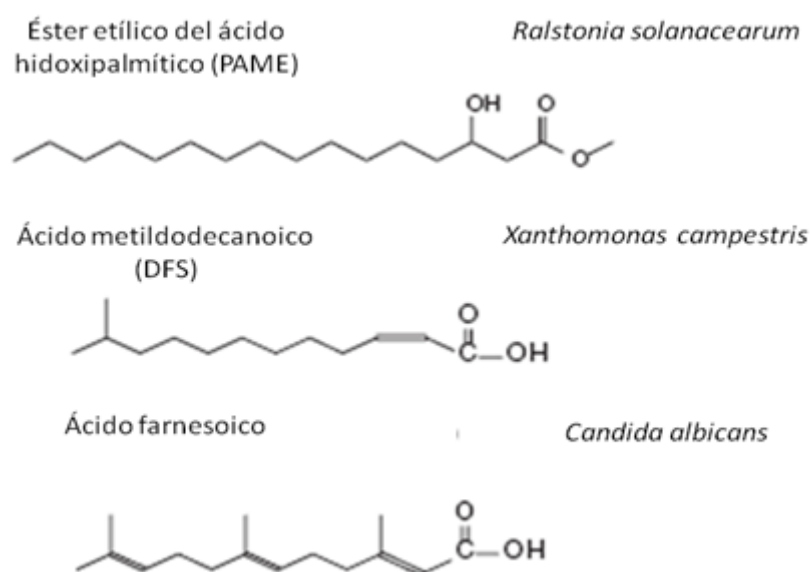


Figura 1.7. Estructura química de otros AI. Los tres AI están implicados en la producción de factores de virulencia.

En el trabajo de 2008 de Schaefer *et al.*, se demostró que la bacteria fotosintética *Rhodopseudomonas palustris* usa una acil-HSL sintasa para producir p -coumaroil-HSL siempre y cuando en el medio se añada ácido p -coumárico en lugar de ácidos grasos para la síntesis de la cadena lateral. Esta bacteria tiene un receptor de señal con homología a los elementos LuxR, que responde a la presencia de p -coumaroil-HSL regulando la expresión de ciertos genes (Figura 1.8.). Además, este tipo de AI se ha detectado también en *Bradyrhizobium* sp. y *Silicibacter pomeroyi*.

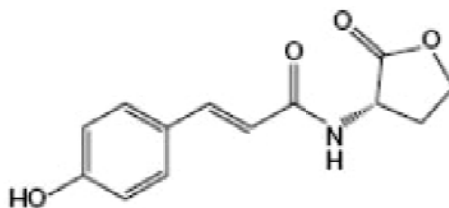


Figura 1.8. Estructura química de la p-coumaroil-HSL. Este AI es sintetizado por las mismas sintetas de AHL cuando en el medio se añade ácido p-coumarico en lugar de ácidos grasos.

Por último, en *Bradyrhizobium japonicum* USDA110, se han identificado recientemente dos genes de síntesis de AI homólogos a *luxI*, que están implicados en la producción de AI que tienen el anillo lactónico y una cadena acilo ramificada (Figura 1.9.). Esta molécula, la isovaleril-homoserina lactona (IV-HSL), regula la expresión de ciertos genes, entre los que se encuentra el propio gen de síntesis del AI (Lindemann *et al.* 2011).

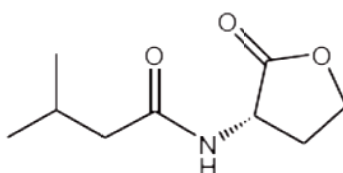


Figura 1.9. Estructura de la isovaleril-homoserina lactona. La IV-HSL, al igual que las AHL, posee un anillo lactónico y una cadena acilo pero, en el caso de la IV-HSL, esta cadena está ramificada.

1.2.2.- Sintetas de autoinductores

Cada uno de los tipos de AI es sintetizado por una o varias enzimas que se denominan sintetas o sintetasas de AI.

1.2.2.1.- Sintetas de AHL

Existen tres tipos de proteínas implicadas en la síntesis de AHL, las de tipo LuxI, de tipo LuxM/AinS y, por último, las de tipo HdtS.

- **De tipo LuxI**

LuxI es la enzima responsable de la síntesis de AHL en los sistemas de QS de *V. fischeri*. Los genes de síntesis de AHL de otras muchas bacterias, incluidas especies de *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Erwinia* y *Burkholderia*, son homólogos a *luxI* y sus productos poseen residuos aminoacídicos conservados necesarios para la actividad catalítica (Costa y Loper, 1997; Gonzalez y Marketon, 2003; Khan *et al.*, 2005; Labbate *et al.*, 2004; Lewenza *et al.*, 1999). Las proteínas sintetas de la familia LuxI catalizan la unión de S-adenosilmetionina (SAM) con una acil-proteína transportadora de acilos (acil-ACP). Esto implica que las AHL provienen de un grupo homoserina lactona derivado del metabolismo de los aminoácidos y una cadena acilo lateral derivada del metabolismo de los ácidos grasos (Figura 1.10.). A partir de esta base se generan las diferentes AHL caracterizadas por la longitud de la cadena lateral y por el grado de oxidación del carbono 3, que puede poseer un sustituyente de tipo oxo, de tipo hidroxilo o estar totalmente reducido (Fuqua *et al.* 2001).

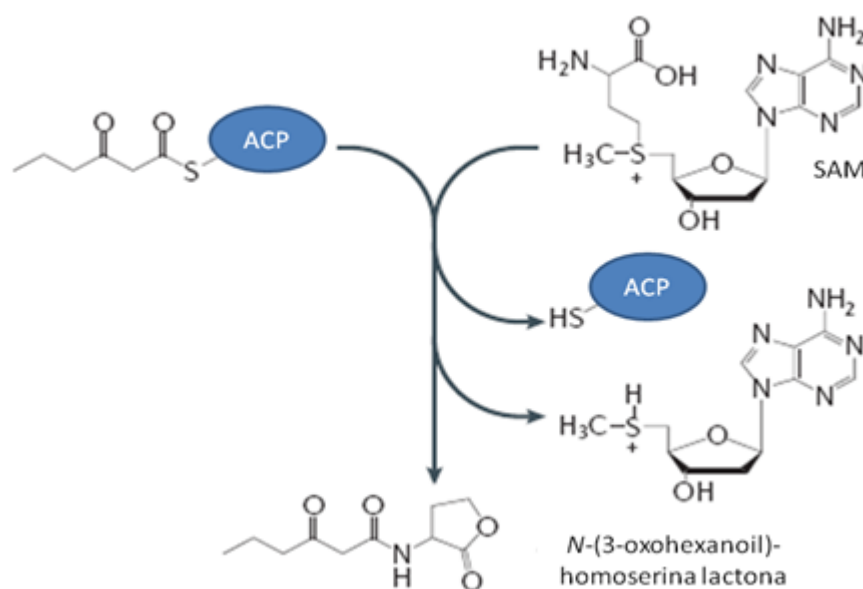


Figura 1.10. Reacción catalizada por proteínas de la familia LuxI. La síntesis de AHL tiene lugar mediante la reacción entre S-adenosil metionina (SAM) y una acil-ACP (proteína transportadora de grupos acilo), catalizada por enzimas de la familia LuxI.

- **De tipo LuxM/AinS**

Los productos de los genes *luxM* de *V. harveyi* y *ainS* de *V. fischeri* intervienen en la síntesis de AHL a pesar de no presentar homología con LuxI (Bassler *et al.* 1993). Estas dos sintasas comparten un dominio muy conservado y dirigen la síntesis de 3-OH-C4-HSL y C8-HSL, respectivamente. Estudios *in vitro* indican que AinS cataliza la síntesis de C8-HSL a partir de SAM y una acil-ACP (como ocurría en el caso de LuxI), pero también a partir de SAM y una acil coenzima A (Hanzelka *et al.*, 1999).

- **De tipo HdtS**

Un tercer tipo de AHL sintasa, la proteína HdtS, fue descubierta en *P. fluorescens* F113. Cuando el gen *hdtS* de esta bacteria se introdujo y expresó en *E. coli*, se detectó la presencia en los sobrenadantes de cultivos de esta bacteria la 3-OH-C14-HSL, la C10-HSL y la C6-HSL. Esta proteína no presenta homología ni con LuxR ni con LuxM, sino con proteínas de la familia de la ácido lisofosfatídico acil transferasa. Esta familia de proteínas son las responsables de la transferencia de grupos acilos al ácido lisofosfatídico para generar el ácido fosfatídico. Se ha sugerido que HdtS podría transferir cadenas acilo desde el acil-ACP o el acil-CoA a SAM, generándose las AHL (Laue *et al.*, 2000).

1.2.2.2.- Sintetas de AI-2

LuxS es la sintasa responsable de la producción del AI-2 en *V. harveyi* (Surette *et al.*, 1999). Esta enzima es una S-ribosilhomocisteinasa que cataliza la rotura del enlace tioéter de la S-ribosilhomocisteína para producir L-homocisteína y 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (Figura 1.11.). Este último es el precursor común del AI-2, ya que éste puede variar en su forma final según la especie que lo produzca (Figura 1.3.) (Miller *et al.*, 2004). La síntesis del AI-2 depende del gen *luxS* (Surette *et al.*, 1998), que no tiene homología con ningún otro gen de síntesis de AHL (*luxI*, *luxM/ainS* o *hdtS*). Esta catálisis, además, es común tanto para bacterias Gram-negativas como para bacterias Gram-positivas. Se han identificado un gran número de genes homólogos al gen *luxS* de *V. harveyi* en bacterias Gram-negativas y en bacterias Gram-positivas, aunque hasta la fecha no se han identificado en α -Proteobacterias.

Estudios de cristalografía por rayos-X muestran que LuxS es un homodímero con dos sitios activos idénticos en la interfase de unión entre cada dímero. Según la mayoría de los autores cada sitio activo contiene un ión metálico catalítico, el Zn^{2+} (Hilgers y Ludwig, 2001; Lewis *et al.*, 2001; Ruzheinikov *et al.*, 2001).

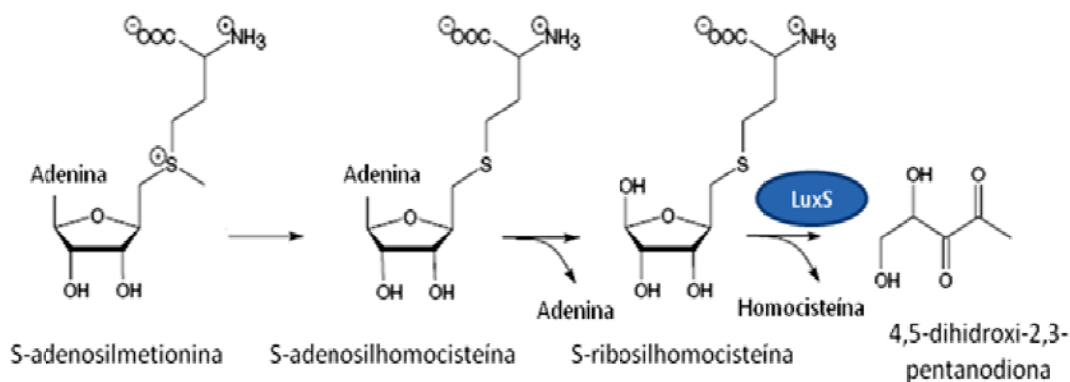


Figura 1.11. Biosíntesis del precursor del AI-2. La biosíntesis del precursor del AI-2, la 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona es llevada a cabo por la proteína LuxS, una S-ribosilhomocisteinasa. El proceso de síntesis se inicia a partir de S-adenosilmetionina (SAM) y requiere una metiltransferasa y una nucleosidasa para producir el sustrato de LuxS, la S-ribosilhomocisteína.

1.2.2.3.- Sintetas de otros tipos de AI

Hasta la fecha no se conoce qué gen o genes están implicados en la síntesis de los dipéptidos cíclicos. Sin embargo, se ha comprobado que estos compuestos son aislados de sobrenadantes de cultivos de *P. aeruginosa* crecida en medio mínimo sin aminoácidos y con una única fuente de carbono, de tal forma que la síntesis de estos AI deber ser *de novo* (Holden *et al.* 1999).

En el caso de la bradyoxetina ocurre algo parecido, se sabe que se produce de manera dependiente de la densidad celular y, especialmente, en medios de cultivo deficientes en Fe^{3+} , pero no se conoce qué gen o genes están implicados en la síntesis de este AI (Loh *et al.*, 2002b).

La ruta de síntesis de las alquil-quinolonas, por el contrario, está perfectamente caracterizada. Existen dos vías de síntesis de los AI de tipo alquil-quinolona (PQS y HHQ). La primera tiene lugar a partir del ácido siquímico y la segunda, a partir del

triptófano. En cualquiera de los dos casos se llega al mismo precursor, el ácido antranílico. La catálisis de este precursor hasta el AI HHQ es llevada a cabo por el producto del operón *pqsABCDE* y la síntesis de la PQS a partir de HHQ es llevada a cabo por el producto del gen *pqsH* (Dubern y Diggle, 2008).

1.2.3.- Reguladores del Quorum Sensing

1.2.3.1.- Reguladores de tipo LuxR

La regulación de genes dependiente de QS es llevada a cabo por proteínas reguladoras de la transcripción que se activan tras su unión a los AI. LuxR es el activador transcripcional en *V. fischeri* (Stevens *et al.*, 1994). Esta proteína se une a la 3-oxo-C6-HSL (AI sintetizado por LuxI) en su dominio de unión a inductor (extremo amino-terminal) y forma un dímero con otro elemento LuxR-AHL. En su extremo carboxi-terminal posee un dominio hélice-giro-hélice de unión al ADN que se une a una secuencia específica denominada *lux box* (Eberhard *et al.*, 1981). Estudios de cristalografía llevados a cabo en *A. tumefaciens* sugieren que, tras la unión de la AHL, la proteína TraR (homóloga a LuxR) sufre un cambio conformacional, forma un dímero y activa así la transcripción de ciertos genes, que suelen poseer la secuencia *lux box* precediendo al inicio del gen (Zhu y Winans, 2001). Las proteínas de tipo LuxR, una vez unidas al ADN, reclutan a la ARN polimerasa, iniciándose la transcripción génica (Stevens *et al.*, 1994; Stevens *et al.*, 1999; Stevens y Greenberg, 1997). La inmensa mayoría de los complejos AHL-LuxR activan la transcripción de genes, aunque se ha descrito la inhibición de la expresión de genes en ciertos casos (Andersson *et al.*, 2000; Beck von Bodman y Farrand, 1995; Beck von Bodman *et al.*, 1998).

1.2.3.2.- Reguladores de tipo LuxP/Q

Los sistemas de QS que utilizan el AI-2 basan la detección de esta molécula en dos proteínas, LuxP y LuxQ. LuxP es un receptor periplásmico que se une al AI-2. LuxP modula la actividad del sensor-quinasa LuxQ, que está en la cara citoplásmica de la membrana, por lo que transmite la captación del AI-2 al interior celular. LuxP pertenece a la familia de las proteínas de unión periplásmica que se unen a ligandos atrapándolos

entre dos dominios. LuxQ es una proteína híbrida de dos componentes, un dominio sensor periplásmico y un dominio histidina-quinasa (Henke y Bassler, 2004; Mok *et al.*, 2003). A bajas densidades celulares, LuxQ actúa como una quinasa y autofosforila residuos histidina dentro del propio dominio histidina quinasa. Se inicia entonces una cascada de fosforilaciones que termina en la fosforilación de LuxO. LuxO-fosfato es la responsable de la represión de LuxR, el regulador transcripcional activador de la luminiscencia en *V. harveyi*. A altas densidades celulares, la unión del AI-2 a LuxP, inicia la desfosforilación de LuxQ, con lo que la cascada de fosforilaciones se invierte y LuxO pierde el fosfato, inactivándose. Es así como LuxR deja de reprimirse, activándose la expresión de genes implicados en la producción de bioluminiscencia (Mok *et al.*, 2003; Nealson *et al.*, 1970).

1.2.4.- Regulación negativa del Quorum Sensing

Las bacterias poseen una serie de mecanismos para degradar o inhibir la producción de AI. Algunos de estos sistemas son completamente necesarios para el correcto funcionamiento de los propios sistemas de QS de las bacterias. En otros casos, su cometido es interferir en los sistemas de QS de otras bacterias.

1.2.4.1.- Proteínas Antiactivadoras

En *A. tumefaciens*, a la actividad de la proteína reguladora del QS TraR se opone otra proteína, TraM. Tanto el gen *traR* como el *traM* se encuentran en el plásmido Ti de esta bacteria, pero también están presentes en los plásmidos simbióticos de bacterias de la familia *Rhizobiaceae* (Luo *et al.*, 2000; Swiderska *et al.*, 2001). La actividad inhibidora de la proteína TraM es completamente necesaria para el funcionamiento normal de los sistemas de QS de *A. tumefaciens*. El sistema *tra* de QS regula la transferencia por conjugación y replicación del plásmido Ti en esta bacteria. De esta forma, el mutante *traM* es hiperconjugador, incluso a bajas densidades celulares (Zhu y Winans, 2001). Es por ello por lo que la función de TraM es permitir la conjugación del plásmido Ti únicamente a elevadas densidades celulares. Así pues, con bajas densidades celulares, TraM se une a las proteínas TraR disponibles formando un heterodímero que interacciona con la caja *tra*, impidiendo la activación de los genes de transferencia de

plásmidos. Sin embargo, a altas densidades celulares, la concentración de AI aumenta y empieza a competir con TraM por la unión a TraR, iniciándose la activación de los genes regulados por el complejo TraR-AHL. Entre los genes regulados por TraR-AHL se encuentra el propio gen *traR*, por lo que se incrementa la cantidad de proteínas TraR disponibles para su activación por unión de las AHL (Hwang *et al.*, 1999; Piper y Farrand, 2000).

1.2.4.2.- Proteínas homólogas a los reguladores de tipo LuxR

TrlR (*TraR-like regulator*) es otra proteína cuya función se opone a la de la proteína TraR en *A. tumefaciens*. TrlR posee un extremo amino-terminal muy parecido al de la proteína TraR (181 aminoácidos), pero debido a una mutación de cambio de fase, la zona carboxi-terminal ha perdido completamente la homología. Esto quiere decir que reconoce a las AHL y puede formar dímeros con TraR-AHL, pero no puede inducir la expresión de los genes regulados por TraR. Al igual que en el caso de TraM, esto impide, junto con la acción de TraM, que a bajas densidades poblacionales, cuando la síntesis de AHL es basal, TraR se active. Solo a altas densidades poblacionales, cuando la concentración de AHL es alta, estos AI compiten por la unión a TraR (Chai *et al.*, 2001).

Pero *A. tumefaciens* no es la única bacteria que posee este tipo de proteínas antagonistas. En *P. aeruginosa*, la proteína QscR (*quorum sensing control repressor*) es un homólogo de LasR y RhlR, los reguladores transcripcionales de los sistemas de QS de esta bacteria. La función de QscR es reprimir los sistemas de QS *Las* y *Rhl* en los estadios iniciales del crecimiento, de hecho un mutante en el gen *qscR* expresa mucho antes los genes *lasI* y *rhlI* que la estirpe silvestre y, consecuentemente, la producción de AHL es prematura (Chugani *et al.*, 2001; Ledgham *et al.*, 2003). Estudios recientes muestran que esta proteína se une a una de las AHL, la 3-oxo-C12-HSL, que es sintetizada por LasI, y activa su propio operón, por lo que compete con LasR en la unión al AI (Lee *et al.*, 2006).

1.2.4.3.- Enzimas que degradan las AHL

El gen *attM* codifica una enzima que hidroliza el anillo lactónico de la 3-oxo-C8-HSL, el AI producido por el sistema Tra de QS de *A. tumefaciens* (Zhang *et al.*, 2002). Este gen es reprimido por *attJ* durante la fase exponencial de crecimiento, de tal forma que se acumulan AHL durante esta fase. En la fase estacionaria, el gen *aatJ* deja de expresarse y *attM* deja de reprimirse, con lo que se degradan rápidamente las AHL presentes en el medio. Zhang *et al.* (2004) demostraron que esta degradación está mediada por la alarmona ppGpp. Esta molécula, en las condiciones de déficit nutricional que se dan en la fase estacionaria, induce la degradación de las AHL por la lactonasa AttM, inhibiéndose así el proceso de la conjugación, que es muy costoso energéticamente.

En diferentes especies del género *Pseudomonas* se han descubierto enzimas con actividad degradadora de AHL, acilasas y lactonasas (Huang *et al.*, 2003). Estas enzimas tienen especificidad por AHL de cadena larga, e incluso algunas especies crecen usando como fuente de carbono a las propias AHL.

Por último, existen también algunos microorganismos que inactivan las AHL mediante rotura del enlace amida de las AHL (Lin *et al.*, 2003) o incluso por oxidación del carbono 3 de las 3-oxo-HSL (Uroz *et al.*, 2005).

1.2.4.4.- Represión mediante ARNi

Lenz *et al.* (2004) descubrieron que los sistemas de QS de *V. harveyi* y *V. cholerae* están regulados por moléculas pequeñas de ARN reguladoras, los ARN interferentes (ARNi). Ambas bacterias poseen un sistema de regulación similar en el que, a bajas densidades celulares se dan una serie de fosforilaciones que finalizan con la fosforilación de LuxO. LuxO-fosfato activa la expresión de un represor que inhibe la expresión del operón *lux*. Los cuatro ARNi descubiertos, *qrr1*, *qrr2*, *qrr3* y *qrr4*, se unen además a los ARN mensajeros del gen *luxR* de estas bacterias, favoreciendo su rápida degradación. De esta forma, a bajas densidades celulares los sistemas de producción de bioluminiscencia están totalmente reprimidos, pero preparados para una rápida activación cuando la densidad celular sea la adecuada (Lenz *et al.*, 2004).

1.3.- Biosensores bacterianos de QS

Una forma de detectar la presencia de AI es mediante la utilización de biosensores bacterianos. Estas bacterias detectan gran variedad de AI a concentraciones muy bajas (Cha *et al.* 1998). Un resultado negativo no implica la ausencia de AI en la muestra sino que puede deberse a que no se superó el límite de detección del biosensor o a que no puede reconocer a ese tipo de moléculas AI. Los biosensores bacterianos se usan para detectar AI en ensayos de difusión en placa, en cromatografía en capa fina, en fracciones provenientes de HPLC, etc.

1.3.1.- *Chromobacterium violaceum* CV026

C. violaceum CV026 es una estirpe mutada en el gen *cviI* mediante inserción del transposón Tn5 (Throup *et al.*, 1995). A diferencia de la estirpe silvestre, el mutante carece de la sintasa CviI, que interviene en la producción de la hexanoil homoserina lactona (C6-HSL) que, a su vez, induce la producción del pigmento púrpura violaceína (Ballantine *et al.*, 1958). No obstante, la producción de pigmento se restaura cuando las células se incuban con un cultivo de la estirpe silvestre de *Chromobacterium* productora de AHL o bien cuando se agrega al medio AHL exógena. Se han descrito dos tipos de bioensayos con *C. violaceum* CV026, directo y reverso, que revelan la presencia de diferentes tipos de AI (McClellan *et al.*, 1997).

Bioensayo directo. Este bioensayo permite detectar la presencia de AI exógenos procedentes de sobrenadantes bacterianos o exudados de semillas que se añaden al medio de cultivo donde crece la bacteria. Los AI exógenos activan la producción de violaceína, por lo que el resultado positivo implica la producción del pigmento violeta (Figura 1.12.A). Este bioensayo típicamente detecta AHL de cadena corta: la C4-HSL, la C6-HSL, la 3-oxo-C6-HSL, la C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL (McClellan *et al.*, 1997).

Bioensayo reverso. El ensayo reverso permite detectar la presencia de AI exógenos que compiten con la C6-HSL sintética (propia de esta bacteria) que se añade al medio de cultivo donde crece *C. violaceum* CV026. La adición de C6-HSL sintética activa la producción de violaceína en *C. violaceum* CV026, mientras que los AI exógenos (normalmente AHL de cadena larga) que se detectan impiden la acción de la C6-HSL sintética. El mecanismo de competencia generalmente se produce porque los AI

exógenos se unen al regulador transcripcional (proteína de tipo LuxR), por lo que no se da la activación de los genes implicados en la producción de violaceína. El resultado positivo del ensayo reverso se traduce en la no producción de violaceína (Figura 1.12.B). Suele emplearse para detectar AHL de cadena larga (C10-HSL, 3-oxo-C10-HSL, C12-HSL y 3-oxo-C12-HSL) y moléculas que interfieren en el QS bacteriano (McClellan *et al.*, 1997; Tepliski *et al.*, 2000).

1.3.2.- *Agrobacterium tumefaciens* NT1 (pZRL4)

La estirpe *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4), que carece del plásmido Ti, está transformada con el plásmido pZLR4 que contiene una fusión *traG::lacZ* y el gen *traR* del plásmido pTiC58 (Cha *et al.*, 1998). Por lo tanto, se trata de una estirpe incapaz de producir su propio autoinductor y en la que la fusión *lacZ* sólo se expresa en presencia de AI exógenos. Los bioensayos con este biosensor son positivos cuando aparece un halo azul, que resulta de la degradación del sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal) que contiene el medio de cultivo, sobre el fondo blanco correspondiente a las células crecidas de *A. tumefaciens* (Figura 1.12.C). Es un biosensor especialmente sensible y con un rango de detección de diferentes AI muy alto, ya que detecta la C6-HSL, la C8-HSL, la C10-HSL, la C12-HSL, la C14-HSL, y sus respectivos derivados oxo- e hidroxil- (Farrand *et al.*, 2002).

1.3.3.- *Escherichia coli* JM109 (pSB536)

E. coli JM109 (pSB536) es una estirpe que porta la construcción génica *ahyR-PahyI::luxCDABE* en el plásmido pSB536. Los genes *ahyR/I* provienen de *Aeromonas hydrophila*, una bacteria Gram-negativa que es patógeno oportunista de ciertos mamíferos y peces. En este plásmido, se ha clonado el gen que codifica el receptor de los AI (AhyR) y el promotor del gen de síntesis de AI (*PahyI*), que está regulado por AhyR-AI, fusionado al operón de bioluminiscencia (*luxCDABE*). Este biosensor en presencia de AI, especialmente AHL de cadena corta, emite bioluminiscencia (Figura 1.12.D). Posee una sensibilidad y rango de detección intermedios entre CV026 y NT1 (pZRL4) ya que detecta la C4-HSL, la 3-oxo-C4-HSL, la C6-HSL, la 3-oxo-C6-HSL, la C8-HSL,

la 3-oxo-C8-HSL, la C10-HSL, la 3-oxo-C10-HSL, la C12-HSL y la 3-oxo-C12-HSL (Swift *et al.*, 1997).

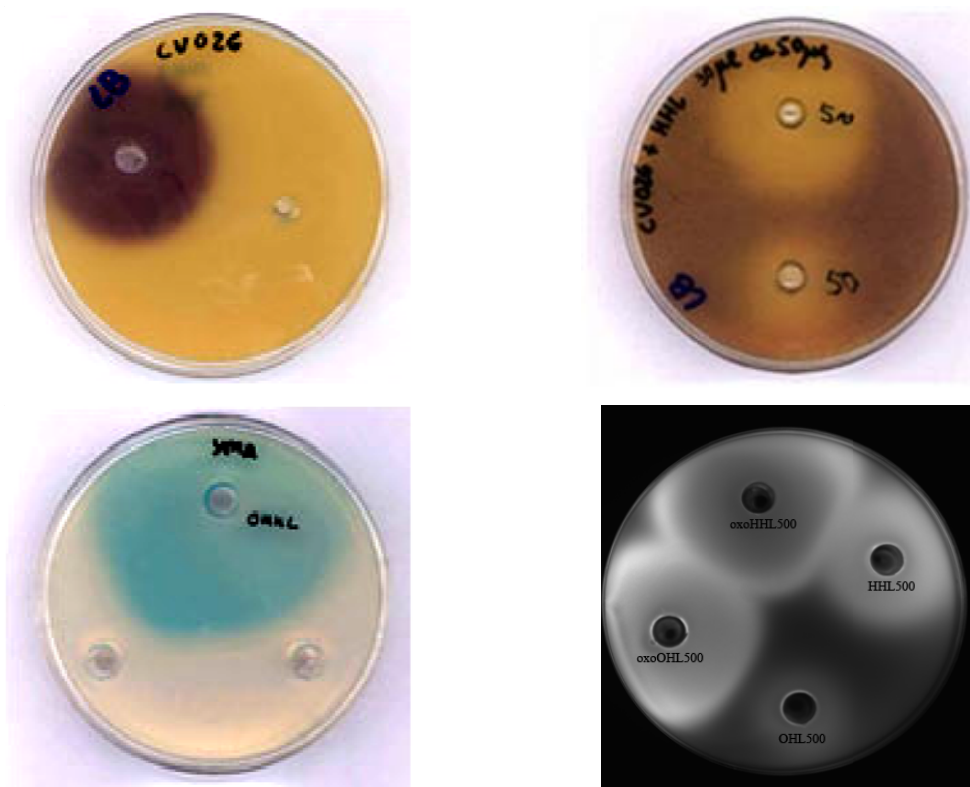


Figura 1.12. Ensayos de difusión en placa con biosensores bacterianos. A. Bioensayo con *C. violaceum* CV026 en ensayo directo. B. Bioensayo con *C. violaceum* CV026 en ensayo reverso. C. Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4). D. Bioensayo con *E. coli* JM109 (pSB536).

1.4.- Simbiosis entre bacterias fijadoras de nitrógeno y leguminosas

Las leguminosas pertenecen a la familia *Leguminosae*, que agrupa más de 18000 especies distribuidas geográficamente por todo el mundo. Desde la antigüedad, las leguminosas se han usado como fuente de alimentación y como plantas forrajeras (Howieson *et al.*, 2000). Muchas leguminosas establecen una relación simbiótica con unas bacterias del suelo denominadas rizobios. Esta relación tiene como fin la formación de nódulos en las raíces de la planta aunque, a veces, puede darse también su

formación en el tallo. En estos nódulos se fija nitrógeno atmosférico y se genera amonio que es asimilable por la planta. Este proceso se denomina fijación biológica del nitrógeno.

1.4.1.- Bacterias fijadoras de nitrógeno

El término rizobio engloba a varios géneros de α -proteobacterias (*Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Allorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium*), pertenecientes a distintas familias del orden *Rhizobiales* (Tabla 1.2). También se pueden considerar como rizobios otras bacterias que no pertenecen al orden *Rhizobiales* pero que nodulan en leguminosas, como son algunas especies de *Methylobacterium* y *Devosia* (α -proteobacterias) y de *Burkholderia* y *Ralstonia* (β -proteobacterias) (Willems, 2006).

Los rizobios son bacterias Gram-negativas, con morfología bacilar, móviles por flagelos, quimiorganoheterótrofos, aerobios y que suelen crecer bien en medios complejos, presentando una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 30 °C. (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Habitan en suelos, pero se concentran en la rizosfera de las leguminosas (las raíces y la zona que las rodea), ambiente, que además de proteger frente a la desecación, la temperatura y el estrés lumínico, posee abundancia de fuentes de carbono y minerales debido a que las plantas exudan grandes cantidades de nutrientes a través de las raíces, tales como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos aromáticos, metabolitos secundarios, así como polisacáridos y proteínas (Walker *et al.*, 2003). Se caracterizan por fijar nitrógeno en asociación simbiótica con las leguminosas.

En esta tesis se estudiarán diferentes aspectos de los sistemas de QS de tres rizobios con especificidades de nodulación muy dispares: *S. fredii* que nodula en más de diez leguminosas diferentes, *R. etli* que nodula en muchos tipos de judía diferentes y *R. sullae* que únicamente nodula en *Hedysarium coronarium*.

Tabla 1.2. Ejemplos de especificidad en la nodulación de diferentes rizobios (Perret *et al.*, 2000; Willems, 2006).

ESPECIE BACTERIANA	PLANTA(S) HOSPEDADORA(S)
Género <i>Azorhizobium</i>	
<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
Género <i>Azorhizobium</i>	
<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania punctata</i> y <i>S. rostrata</i>
Género <i>Bradyrhizobium</i>	
<i>B. elkanii</i>	<i>Glycine</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i>
<i>B. japonicum</i>	<i>Glycine</i> , <i>Arachis</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i>
Género <i>Mesorhizobium</i>	
<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus</i>
<i>M. loti</i>	<i>Lotus</i> , <i>Lupinus</i> , <i>Mimosa pudica</i> , <i>Leucaena</i> , <i>Anthyllis</i>
<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> , <i>Sophora</i> , <i>Halimodendron</i>
<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
Género <i>Rhizobium</i>	
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	<i>Leucaena</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i> , <i>Parasponia</i> y otras
<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. galegae</i>	<i>Galega</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> , <i>Medicago</i>
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia</i>
<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>
<i>R. sullae</i>	<i>Hedysarium coronarium</i>
Género <i>Sinorhizobium</i>	
<i>S. fredii</i>	<i>Glycine</i> , <i>Macroptilium</i> , <i>Vigna</i> , <i>Cajanus</i> y otras
<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i> , <i>Sesbania</i>
<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>
<i>S. xinjiangense</i>	<i>Glycine</i>
<i>S. terangaie</i>	<i>Sesbania</i>

1.4.2.- Fases de la simbiosis

Aunque el establecimiento de la simbiosis es un proceso continuo, se pueden definir varias fases que permiten una mejor comprensión de este fenómeno.

1.4.2.1.- Colonización de raíces: movilidad bacteriana y formación de biofilm

La relación simbiótica comienza con el desarrollo de poblaciones de rizobios en la rizosfera de las leguminosas (van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Vessey *et al.*, 2004; Patriarca *et al.*, 2004). La presencia de compuestos exudados por las raíces de las plantas favorece el desarrollo de un mayor número de microorganismos en la rizosfera que en el suelo abierto circundante, donde la fuente de carbono es limitante. Este fenómeno es conocido como el “efecto rizosfera” (Bolton *et al.*, 1992). La exudación radical se produce principalmente a través de los pelos radicales, aunque también se da a través de las células epidérmicas del ápice de la raíz. La alta concentración de nutrientes en la rizosfera es generada, además de por la exudación de compuestos radicales, por la muerte de las células vegetales por senescencia o por ataque bacteriano. Algunos de estos compuestos presentes en la rizosfera atraen quimiotácticamente a las bacterias del suelo de tal forma que la densidad de microorganismos en la rizosfera, además de por la alta concentración de nutrientes, se favorece por la atracción quimiotáctica de los mismos (Somers *et al.*, 2004). Las bacterias se mueven generalmente a través de líquidos o sobre superficies gracias a apéndices móviles, principalmente los flagelos. La rotación de estos flagelos a través de medios semifluidos se denomina “swimming” y la rotación de flagelos sobre superficies húmedas se denomina “swarming” (Merritt *et al.*, 2007). En muchas bacterias, los fenómenos de movilidad están regulados mediante sistemas de QS, como en el caso de *Serratia liquefaciens*, que regula su movilidad tipo “swarming” mediante un sistema el sistema de QS *swr*, homólogo al sistema *lux* de *V. fischeri* (Daniels *et al.* 2004).

En la rizosfera, algunos de los rizobios forman una comunidad bacteriana, rodeada de una matriz producida por las propias bacterias, que está unida reversiblemente a la superficie de la raíz. A este tipo de agrupación celular se le denomina “biofilm” (Costerton *et al.*, 1995). Los fenómenos de movilidad bacteriana son críticos para la aproximación de la bacteria a la raíz y, de hecho, una vez en la propia rizosfera, son muy importantes para la acumulación de células previa a la formación del biofilm (Merritt *et al.*, 2007). Después de unirse a la superficie de la raíz, los rizobios se multiplican y la comunidad bacteriana adquiere estructura en 3 dimensiones que, en algunos casos, puede poseer canales internos a través de los cuales las bacterias obtienen agua y nutrientes, producen ciertas enzimas y señales moleculares, o excretan

productos tóxicos (Stanley y Lazazzera, 2004). Sin embargo, es difícil diferenciar entre simples agregados celulares unidos a la superficie de la raíz y los propios biofilm. De hecho, el término biofilm se usa tanto para agregaciones bacterianas con matriz, como para microcolonias y para los aglutinamientos y floculaciones bacterianas.

La composición de los biofilm puede variar, aunque típicamente está formado por agua, células y una matriz de polisacáridos formada por exopolisacáridos (EPS) (Sutherland, 2001), que proporciona una barrera contra la difusión de compuestos como antibióticos y sustancias de defensa producidos por los hospedadores, contra estrés ante factores ambientales como radiación, cambios de pH, estrés osmótico y desecación (Gilbert *et al.*, 1997).

Los biofilm bacterianos están ampliamente distribuidos entre los microorganismos y suelen ser importantes en la colonización de muchos ambientes. Los rizobios pueden vivir en ambientes diversos, desde la rizosfera, rica en nutrientes y exudados radicales, hasta en suelos deficientes en nitrógeno, fósforo, agua y nutrientes. En la rizosfera, muchos de los rizobios forman biofilm o al menos microcolonias cuando colonizan la raíz.

Los datos recogidos hasta la fecha de rizobios que forman biofilm en la raíz de leguminosas están resumidos en la Tabla 1.3. No se conoce con exactitud los mecanismos por los que se forma un biofilm bacteriano, aunque se van descubriendo factores que son necesarios para la formación de los mismos en los rizobios. (Tabla 1.3.).

Parece claro pues que, en la formación del biofilm bacteriano intervienen una serie de factores ambientales que desencadenan la activación de mecanismos intrínsecos de la bacteria que culminan con la formación del biofilm. Entre estos mecanismos destacan los sistemas de QS bacteriano, que detectan la población bacteriana y coordinan el proceso de formación de biofilm; la producción de EPS y factores de nodulación, que son necesarios para la formación de la matriz; o los fenómenos de movilidad bacteriana. Todos estos factores son necesarios para la formación del biofilm, que es crucial para el establecimiento de la simbiosis con la leguminosa (Rinaudi y Giordano, 2010). Se cree que la formación de biofilm ocurre en un proceso secuencial de desarrollo, culminando en el establecimiento de las propias comunidades bacterianas (Figura 1.13.).

Tabla 1.3. Rizobios conocidos hasta la fecha que forman biofilm sobre superficies abióticas o sobre raíces de leguminosas (Rinaudi y Giordano, 2010).

ESPECIE BACTERIANA	FACTORES NECESARIOS O IMPLICADOS EN LA FORMACIÓN DE BIOFILM
Género <i>Bradyrhizobium</i>	
<i>B. elkanii</i>	Asociación del rizobio con hongos para formar un biofilm donde se fija nitrógeno atmosférico.
<i>B. japonicum</i>	Ricadhesina, lectina de soja y exopolisacárido
Género <i>Mesorhizobium</i>	
<i>M. huakuii</i>	Quorum sensing
<i>M. tianshanenese</i>	Exopolisacárido
Género <i>Rhizobium</i>	
<i>Rhizobium</i> sp.	Unión a plantas no hospedadoras no mediada por exopolisacárido
<i>R. etli</i>	Movilidad tipo <i>swarming</i>
<i>R. leguminosarum</i>	Sistema de secreción de tipo I, exopolisacárido, proteína RapA1, quorum sensing y glucomanano
Género <i>Sinorhizobium</i>	
<i>S. meliloti</i>	Condiciones ambientales y nutricionales, succinoglucano, factores Nod, quorum sensing y exopolisacárido

1.4. 2.2.- La infección y el desarrollo del nódulo

Tras la colonización de las raíces de la leguminosa, se produce la adhesión de los rizobios a la punta de los pelos radicales (Patriarca *et al.*, 2004). Los mecanismos de unión del rizobio al pelo radical están influidos por las condiciones de acidez del ambiente. Así, en condiciones alcalinas, las lectinas, unas proteínas situadas en los extremos del pelo radical (Hirsch, 1999), podrían liberarse de los pelos radicales y entonces la ricadhesina, una proteína bacteriana dependiente de Ca^{2+} , sería la molécula responsable de la unión. Por el contrario, en condiciones ácidas, sería la ricadhesina la que se liberase de la superficie bacteriana, siendo la lectina la molécula responsable de la unión (Laus *et al.*, 2006; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2007).

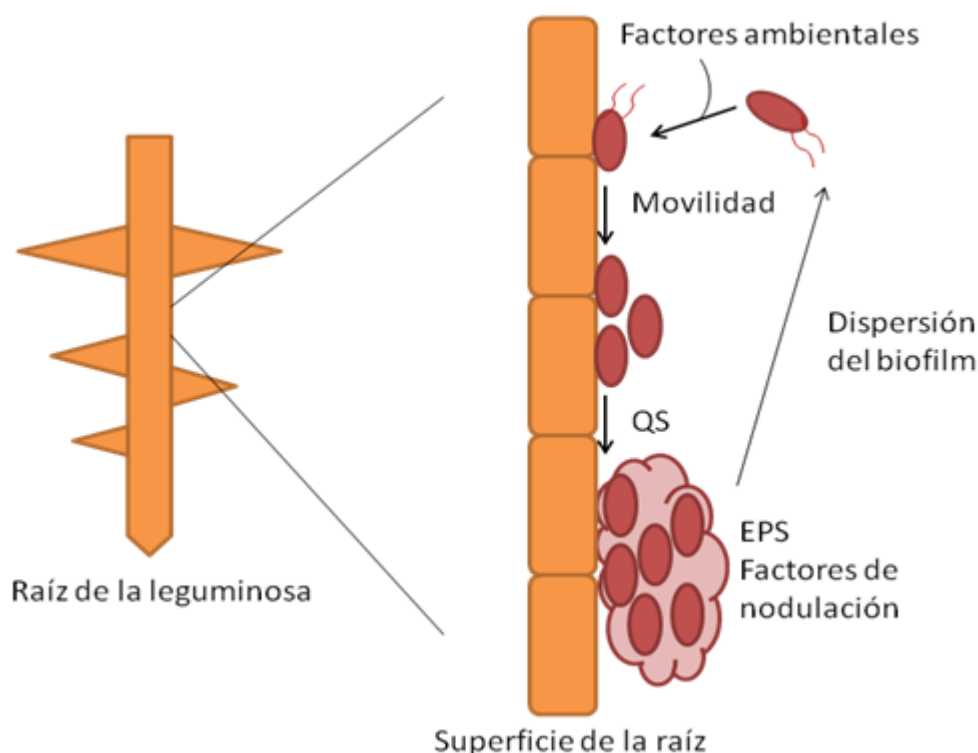


Figura 1.13. Modelo general de formación de biofilm. Señales ambientales y el déficit de nutrientes disparan la formación de biofilm. Los flagelos son necesarios para la aproximación a la superficie de la raíz. Después de la formación de microcolonias, los sistemas de QS coordinan la formación de biofilm y su matriz extracelular, que requiere de EPS y factores de nodulación, lo que proporciona arquitectura tridimensional al biofilm. La dispersión del biofilm permite a la bacteria colonizar otras superficies o sustratos.

La presencia de un rizobio compatible induce la deformación del pelo radical y la formación de una estructura que se asemeja a un cayado de pastor (Geurts y Bisseling, 2002). En ella se genera un bolsillo donde quedan atrapados los rizobios y donde aumenta localmente la concentración de señales simbióticas. Posteriormente, se produce una degradación localizada de la pared celular vegetal, se invagina la membrana plasmática y se origina una estructura tubular conocida como tubo o cordón de infección (Gage, 2004). Los rizobios van penetrando en la raíz a través de estos tubos de infección y se multiplican en su interior.

Paralelamente a la formación del tubo de infección, se produce una reactivación del ciclo celular de las células corticales diferenciadas que van a constituir el primordio nodular (Gage, 2004; Kondorosi y Kondorosi, 2004; Patriarca *et al.*, 2004). Éste, tras crecer y dar lugar a una estructura globular que emerge de la raíz, se va a diferenciar

para originar diversos tipos celulares y formar la compleja estructura nodular. El extremo del tubo de infección avanza hacia el primordio recién desarrollado, donde comienza a ramificarse y extenderse. Los rizobios que han penetrado en la raíz van a llegar a través de los tubos de infección hasta la región central del nódulo en formación. Los tubos de infección carecen de pared celular en su extremo apical, lo que permite la liberación de los rizobios en el interior de las células vegetales mediante un proceso de endocitosis.

Los rizobios liberados del tubo de infección se diferencian a bacteroides, bacterias modificadas con forma irregular rodeadas de una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroide. Esta membrana constituye una interfase esencial para el intercambio de metabolitos entre la célula vegetal y la bacteria. Los bacteroides se multiplican y se rodean, bien individualmente o en pequeños grupos, de la membrana peribacteroidea, constituyendo unas unidades llamadas simbiosomas. En su última etapa de desarrollo, los bacteroides dejan de dividirse y se diferencian hasta bacteroides maduros, capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a amonio por la acción del complejo enzimático denominado nitrogenasa. Aunque probablemente los bacteroides totalmente diferenciados ya no son capaces de dividirse, dentro del nódulo existe un reservorio de bacterias no diferenciadas que pueden volver al suelo y colonizarlo (Kahn *et al.*, 1998).

La forma y anatomía del nódulo dependen exclusivamente de la planta. Existen dos grandes tipos de nódulos (Figura 1.14.): indeterminados, formados principalmente por leguminosas de climas templados como *Medicago sativa* (alfalfa) o *Pisum sativum* (guisante), y determinados, típicos de leguminosas tropicales o subtropicales como *Phaseolus vulgaris* (judía) y *Glycine max* (soja). En los nódulos indeterminados, el primordio se origina en el córtex interno de la raíz y da lugar a un meristemo apical persistente, de modo que continuamente se generan nuevas células que van siendo infectadas, por lo que el nódulo adopta una forma cilíndrica (Figura 1.14. A). El primordio de los nódulos determinados se origina en el córtex externo y da lugar a un meristemo cuya actividad es transitoria, de modo que genera una masa esférica de células que se diferenciarán al unísono (Figura 1.14. B).

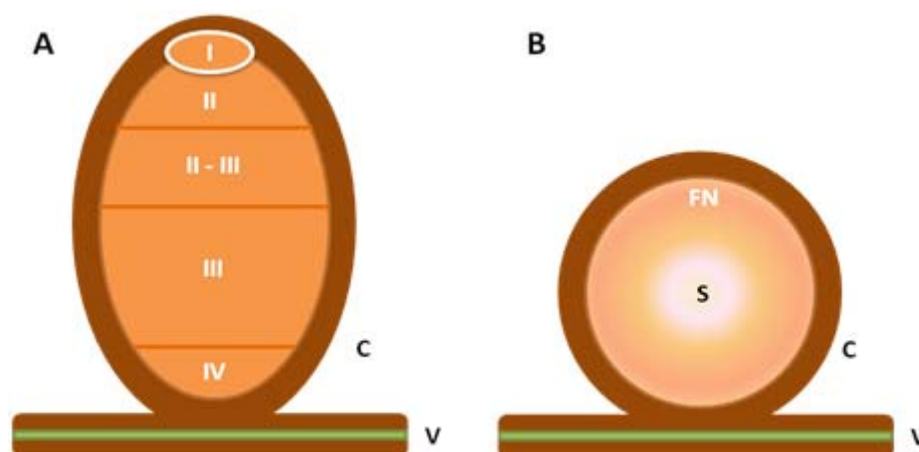


Figura 1.14. Tipos de nódulos. A. Nódulo indeterminado. Se detallan las siguientes zonas: I, meristemo; II, zona de infección; II-III, interzona; III, zona de fijación; IV, zona de senescencia. B. Nódulo determinado. Se detallan las siguientes zonas: FN: zona de fijación, S: zona de senescencia, V: haz vascular, C: córtex de la raíz.

1.4.2.3.- Fijación biológica de nitrógeno

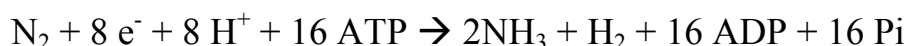
El nitrógeno se encuentra en el suelo de forma combinada y constituye un factor limitante para el crecimiento vegetal. Las fuentes de nitrógeno en la rizosfera son diversas: la materia orgánica en descomposición, el aporte exógeno (fertilización química) y la fijación biológica del nitrógeno atmosférico. Ésta última se lleva a cabo exclusivamente por organismos procariotas denominados diazotrofos (Masson-Boivin *et al.*, 2009). Los procesos biológicos de fijación de nitrógeno dependen básicamente de la capacidad de estos microorganismos, ya sean de vida libre o en simbiosis con otros organismos, de convertir el nitrógeno atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+) mediante la acción de un complejo enzimático llamado nitrogenasa. El amoníaco producido en el proceso de la reducción del nitrógeno es incorporado a esqueletos carbonados, de forma que el producto final de la fijación del nitrógeno (generalmente amidas, ureidos o aminoácidos) es utilizado directamente por la planta (Vessey *et al.*, 2004).

La nitrogenasa es un complejo enzimático sensible al oxígeno que está formado por dos componentes: el componente I, también llamado dinitrogenasa o ferromolibdoproteína, es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$ que contiene cuatro grupos Fe_4S_4 y un cofactor que contiene hierro y molibdeno. El componente II, también denominado nitrogenasa reductasa o ferroproteína, es un homodímero que contiene un grupo Fe_4S_4 (Fischer, 1996). La función de la dinitrogenasa reductasa o componente II es la de

transportar los electrones desde un donador fisiológico (flavodoxina) hacia el componente I o dinitrogenasa para que en su centro activo, el cofactor de hierro y molibdeno, tenga lugar la reducción del nitrógeno. Por su parte, la flavodoxina recibe los electrones de reacciones como la descarboxilación oxidativa del piruvato hasta acetil-CoA y CO₂, reacción catalizada por la piruvato flavodoxina oxidorreductasa. Para que tenga lugar el tránsito electrónico desde el componente II al componente I, se requiere la hidrólisis de al menos dos moléculas de ATP por cada electrón transferido.

La nitrogenasa de las bacterias simbióticas posee características similares a la enzima de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, incluyendo la sensibilidad al O₂ y la capacidad de reducir acetileno, además de nitrógeno. La formación de H₂ es parte del mecanismo de la nitrogenasa, lo que representa una pérdida significativa de energía.

Además de la nitrogenasa, la fijación ó reducción de nitrógeno hasta dos moléculas de NH₃, requiere poder reductor (8e⁻) y un mínimo de 16 moléculas de ATP. La reducción de N₂ está siempre acoplada a la reducción de H⁺ a H₂ mediante la siguiente reacción:



En condiciones fisiológicas normales, se requieren entre 20 y 30 moléculas de ATP por cada molécula de nitrógeno fijado. En consecuencia, la fijación de nitrógeno puede consumir una fracción significativa de la reserva celular de ATP, que es provista por la respiración aeróbica. Por tanto, la principal limitación que encuentran los fijadores libres de nitrógeno es que es un proceso muy costoso energeticamente. En cambio, en la simbiosis rizobio-leguminosa la planta hospedadora cede parte de los productos de la fotosíntesis a la bacteria, que los oxida y obtiene así ATP y poder reductor, necesarios para llevar a cabo la fijación del nitrógeno (Masson-Boivin *et al.*, 2009).

1.4.3.- Bases moleculares de la interacción simbiótica

La nodulación es un proceso complejo que requiere un diálogo molecular entre los dos miembros de la simbiosis y la expresión coordinada de genes de la bacteria y de la planta. La presencia del rizobio induce la formación del nódulo, pero el desarrollo de este órgano es llevado a cabo por la planta (D'Haeze y Holsters, 2002; Patriarca *et al.*, 2004). A lo largo del proceso de la simbiosis intervienen una serie de moléculas

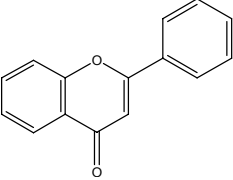
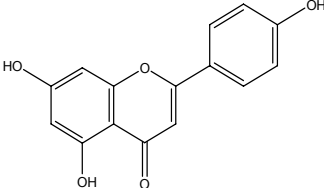
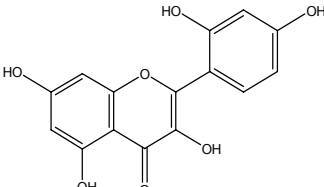
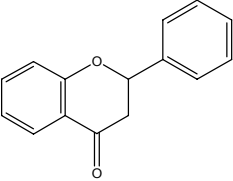
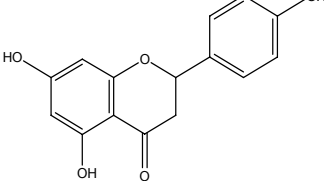
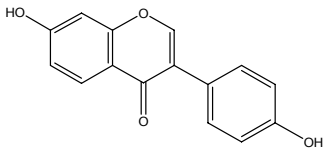
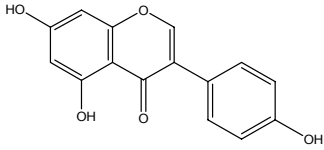
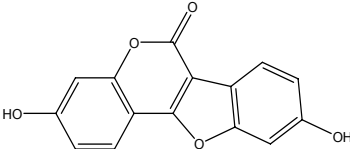
producidas tanto por la planta como por la bacteria que permiten el reconocimiento y la puesta en marcha de los diferentes mecanismos que finalmente permitirán la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Entre las moléculas implicadas en este diálogo molecular se incluyen los flavonoides, los factores de nodulación, los polisacáridos superficiales, las proteínas extracelulares denominadas proteínas Nop (*Nodulation outer proteins*) o las moléculas de tipo AI que regulan los sistemas de QS bacteriano (Broughton *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2000).

1.4.3.1.- Los flavonoides

Los flavonoides se secretan a bajas cantidades de manera continua por las raíces, pero su concentración aumenta en la rizosfera si en ésta existen rizobios compatibles con la leguminosa (Broughton *et al.*, 2000). Estos compuestos activan en la bacteria la expresión de los genes de nodulación (Perret *et al.*, 2000; Spaink, 2000), que son los responsables de que la bacteria sintetice y secrete los factores de nodulación, moléculas señal que van a desencadenar en la planta diversas respuestas como la deformación y curvatura de los pelos radicales o el inicio de la organogénesis nodular (Spaink, 2000; D'Haeze y Holsters, 2002; Geurts y Bisseling, 2002).

Los flavonoides son derivados de la 2-fenil-1,4-benzopirona, y su estructura está constituida por dos anillos aromáticos, A y B, y un anillo de pirona o pirano heterocíclico, el anillo C. Las modificaciones específicas de esta estructura básica producen diferentes clases de flavonoides (Tabla 1.4.): chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoles, isoflavonoides, coumestanos y antocianidinas (Harborne y Williams, 2001). Los flavonoides se suelen almacenar y liberar en forma de glicósidos (unidos a uno o más azúcares), con lo que se aumenta su solubilidad. No todos los flavonoides son inductores de los genes de nodulación. Cada leguminosa secreta un conjunto específico de flavonoides, de manera que cuanto mayor sea el número de flavonoides reconocidos por un rizobio, mayor podrá ser, en principio, su rango de nodulación (Parniske y Downie, 2003).

Tabla 1.4. Estructura química de algunos flavonoides utilizados en esta Tesis.

Flavonoide	Estructura	Masa molecular
<u>Flavonas</u>		
Flavona		222
Apigenina		270
Morina		302
<u>Flavanonas</u>		
Flavanona		224
Naringenina		272
<u>Isoflavonas</u>		
Daidzeína		254
Genisteína		270
<u>Coumestanos</u>		
Coumestrol		268

1.4.3.2.- Los factores de nodulación

En respuesta a los flavonoides exudados por la planta hospedadora, el rizobio sintetiza y secreta una familia de lipo-quitín-oligosacáridos (LCO) denominados factores Nod. Los genes bacterianos responsables de la biosíntesis y secreción de los factores Nod se denominan genes de nodulación, entre los que se incluyen los genes *nod*, *nol* y *noe*. La expresión de estos genes requiere también la participación de la proteína bacteriana NodD, que se transcribe constitutivamente en los rizobios (Broughton *et al.*, 2000).

La proteína NodD es un regulador transcripcional perteneciente a la familia LysR de reguladores de la transcripción. Los flavonoides secretados por las raíces de las leguminosas inducen cambios conformacionales en la proteína NodD. El conjunto NodD-flavonoide se une a una región de ADN altamente conservada de 49 pb denominada caja de nodulación o caja *nod*, situada delante de los genes de nodulación, activando su transcripción. El mecanismo exacto de cómo NodD responde al inductor para iniciar la transcripción de los genes *nod* todavía no se conoce. Se ha sugerido que el complejo NodD-flavonoide se forma en la caja *nod*. La existencia de este complejo aún no se ha demostrado, pero existen evidencias indirectas que indican que se produce una interacción entre ambas moléculas (Peck *et al.*, 2006).

Junto a NodD, existe otro activador, SycM, perteneciente también a la familia LysR de reguladores transcripcionales, que corregula la producción de factores Nod en ausencia de flavonoides (Hanin *et al.*, 1998). También se ha descrito la presencia de represores como NodR que, en *S. meliloti*, reprime la transcripción de los genes *nodD1*, *nodD2* y *nodABC* (Kondorosi *et al.*, 1991) y en *S. fredii*, donde actúa como represor de los genes *nodA*, *nodD1*, *nolO*, *nolX*, *noeL*, *rhcJ*, *hesB*, y *y4pF*, todos ellos con importancia durante la simbiosis (Vinardell *et al.*, 2004).

La mayor parte de los genes de nodulación codifican enzimas involucradas en la producción de los factores de nodulación (Spaink, 2000). La estructura de los factores Nod consiste básicamente en una cadena lineal de 3 a 6 unidades de N-acetil-D-glucosamina (NAcGlc). El extremo no reductor presenta un nitrógeno que está acilado con un ácido graso (Figura 1.15.). Esta estructura presenta una serie de sustituciones o decoraciones de diferente naturaleza que varían en los distintos rizobios. Cada rizobio produce y secreta no sólo un factor Nod, sino una familia de moléculas que actúan de

modo cooperativo para inducir la respuesta adecuada en la planta hospedadora (Minami *et al.*, 1996).

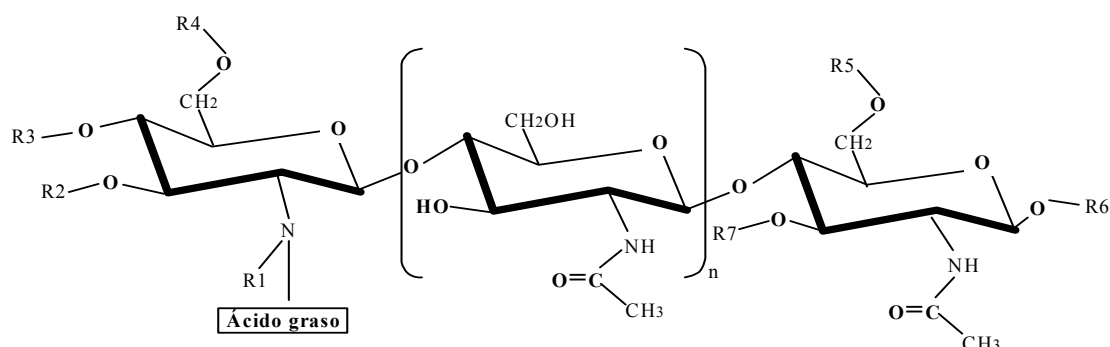


Figura 1.15. Estructura de los factores de nodulación. En *Sinorhizobium fredii*, n varía entre 1, 2 y 3; H es el radical presente en R1, R2, R3, R4, R6 y R7, y fucosa o metil-fucosa en R5. El ácido graso presente puede ser C_{16:0}, C_{16:1}, C_{18:0} y C_{18:1}.

Los genes de nodulación son los responsables de la síntesis del esqueleto básico del oligosacárido, de su decoración y de su transporte (Spaink *et al.*, 1995; Downie, 1998; Spaink, 2000). Entre los primeros se encuentran los genes *nodABC*, que forman un operón y que codifican una aciltransferasa, una quitina desacetilasa y una N-acetilglucosamina transferasa, respectivamente. Estos genes se encuentran presentes en todos los rizobios. Las mutaciones en *nodABC* impiden la producción de factores de nodulación y, en consecuencia, la nodulación. Otros genes de nodulación presentes en todos los rizobios son *nodIJ*, que codifican proteínas que son miembros de la familia de los transportadores ABC y que están involucradas en la secreción de los factores Nod (Spaink *et al.*, 1995)

Existe una gran variedad de genes de nodulación que participan en la decoración de los LCO y cada rizobio sólo posee una parte de ellos. Las decoraciones de los LCO también juegan un papel importante en la determinación del conjunto de leguminosas que puede nodular un determinado rizobio (Lerouge *et al.*, 1990).

Los factores de nodulación desencadenan, una vez se unen a ciertos receptores, diversas respuestas en la planta, como la despolarización de la membrana de la célula del pelo radical, la deformación y curvatura del pelo radical o la inducción de la organogénesis nodular (Ferguson *et al.*, 2010).

Entre los receptores de los factores Nod se encuentran las quinasas receptoras con dominios extracelulares ricos en leucina (LRR), cuya inactivación impide la interacción de la planta tanto con rizobios como con micorrizas, aunque el pelo radical sigue deformándose en respuesta a la presencia de los factores Nod. También se han encontrado otras quinasas receptoras, con motivos LysM en su dominio extracelular, y que sí son esenciales para la deformación del pelo radical en presencia de los LCOs (Ferguson *et al.*, 2010).

1.4.3.3.- Los polisacáridos de superficie

Para el establecimiento de la interacción simbiótica, además de los factores Nod, son necesarias otras moléculas como los polisacáridos de superficie. Los rizobios producen diversas clases de polisacáridos que juegan un papel importante en la interacción con la leguminosa hospedadora. Los más importantes en cuanto a su relevancia simbiótica son los β -glucanos cíclicos (GC), los lipopolisacáridos (LPS), los exopolisacáridos (EPS) y los polisacáridos capsulares tipo antígeno-K (KPS) (Fraysse *et al.*, 2003; Gage, 2004). Todos estos polisacáridos podrían actuar protegiendo a la bacteria frente a condiciones ambientales o frente a las respuestas defensivas de la planta y también como señales durante el proceso de nodulación (Mithöfer, 2002; D'Haeze y Holsters, 2002).

En *S. meliloti*, algunos polisacáridos de superficie como el succinoglucano o el exopolisacárido II (EPSII) permiten a la bacteria invadir eficientemente la raíz de *Medicago sativa* para establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno (Pellock *et al.*, 2002). Se ha descrito que la síntesis del EPSII está regulada por la proteína ExpR, que únicamente se activa en presencia de uno de los AI sintetizado por la proteína SinI, la 3-oxo-C16:1-HSL (Marketon *et al.*, 2003).

1.4.3.4.- El sistema de secreción de tipo III

La primera evidencia de la existencia en los rizobios de genes que pueden estar implicados en la biosíntesis del sistema de secreción de tipo III (T3SS) se obtuvo tras comprobar que *S. fredii* USDA257, en presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación, secretaba una serie de proteínas al medio extracelular, que posteriormente se han denominado como proteínas Nop (*"Nodulation outer proteins"*).

Tras secuenciar el plásmido simbiótico de *Rhizobium* sp. NGR234 (Freiberg *et al.*, 1997) se identificaron los genes involucrados en la biosíntesis del T3SS rizobiano, que se agrupan en la denominada región *tts*. Al secuenciar el genoma de la estirpe MAFF303099 de *M. loti* (Kaneko *et al.*, 2000) y la isla simbiótica de *B. japonicum* USDA110 (Göttfert *et al.*, 2001) se han identificado otros sistemas de secreción. Además, dos estirpes de *S. fredii*, USDA257 y HH103, también poseen el T3SS (Krishnan *et al.*, 2003; de Lyra *et al.*, 2006).

Todas las agrupaciones de genes del T3SS de los rizobios secuenciadas hasta el momento contienen 10 fases abiertas de lectura u ORF (del inglés, Open ReadinG Frame) que son homólogas a los genes *ysc* y *hrc* (Hueck, 1998; Bogdanove *et al.*, 1996). Las proteínas Ysc, de *Yersinia* spp., y Hrc, de bacterias patógenas de plantas, son absolutamente necesarias para la secreción de los factores de virulencia.

En los rizobios, se ha postulado que las proteínas Nop están implicadas en la determinación del rango de hospedador, ya que estas proteínas pueden modular la respuesta de defensa de la planta en las fases iniciales de la simbiosis (Lopez-Baena *et al.*, 2009).

1.5.- QS en bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno

Como previamente se ha descrito, las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium* y *Azorhizobium*, conocidos como rizobios, tienen la capacidad de infectar raíces de las leguminosas e inducir la diferenciación de unos órganos, los nódulos, donde se reduce el nitrógeno atmosférico hasta amonio, asimilable por las plantas. Se ha demostrado que muchos de los aspectos necesarios para esta interacción bacteria-planta están mediados por sistemas de QS, entre ellos el control de funciones necesarias para la colonización de la rizosfera, la competitividad, el establecimiento de la simbiosis, la formación del simbiosoma, la fijación de nitrógeno, etc. (Tabla 1.5.).

Tabla 1.5. Algunos sistemas de QS en bacterias de la familia *Rhizobiaceae*.

Organismo	Genes (localización) Autoinductor	Fenotipo regulado	Referencia
<i>A. tumefaciens</i>	<i>traR/traI</i> (pTi) 3-oxo-C8-HSL	Transferencia de plásmido	Piper <i>et al.</i> (1993) y Fuqua <i>et al.</i> (1994)
<i>R. leguminosarum</i>			
bv. <i>viciae</i>	<i>cinR/cinI</i> (C) 3-OH-C14:1-HSL <i>rhiR/rhiI</i> (pRL1JI) C6-C7-C8-HSL <i>traR/traI</i> (pRL1JI) 3-oxo-C8-HSL, C8-HSL	Inhibición del crecimiento Eficiencia en la nodulación Transferencia de plásmido	Lithgow <i>et al.</i> (2000) Cubo <i>et al.</i> (1992) y Rodelas <i>et al.</i> (1999) Wilkinson <i>et al.</i> (2002) y Danino <i>et al.</i> (2003)
bv. <i>phaseoli</i>	<i>raiR/raiI</i> (pNS) 3-OH-C8-HSL, C8-HSL	Desconocido	Wisniewski-Dye <i>et al.</i> (2002)
<i>R. etli</i>			
CNPAF512	<i>cinR/cinI</i> (C) 3-OH-cadena larga-HSL <i>raiR/raiI</i> (C) cadena corta-HSL	Fijación de nitrógeno, desarrollo del simbiosoma, inhibición del crecimiento. Supresión de la nodulación de la fijación de nitrógeno, inhibición del crecimiento.	Daniels <i>et al.</i> (2002) Daniels <i>et al.</i> (2002)
CFN42	<i>traR/traI</i> (p42a) 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL	Transferencia de plásmido	Tun-Garrido <i>et al.</i> (2003)
<i>S. meliloti</i>			
Rm1021	<i>sinR/sinI</i> (C) C12-HSL, 3-oxo-C14-HSL, C16:1-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL 3-OH-C16:1-HSL, C18-HSL	Producción de EPSII, swarming	Marketon <i>et al.</i> (2002,2003) y Gao <i>et al.</i> (2005)
	<i>melR/melI</i> (putativo) C8-HSL y cadena corta-HSL	Desconocido	Marketon <i>et al.</i> (2002)
Rm41	<i>traR/traI</i> (pRm41a) 3-oxo-C8-HSL	Transferencia de plásmido	Gonzalez y Marketon (2003)
<i>Rhizobium sp.</i>			
NGR234	<i>traR/traI</i> (pNGR234a) 3-oxo-C8-HSL Genes desconocidos, otras AHL <i>ngrR/ngrI</i> , AHL desconocidas	Transferencia de plásmido, Inhibición del crecimiento Desconocido Desconocido	He <i>et al.</i> (2003) He <i>et al.</i> (2003) Schmeisser <i>et al.</i> (2009)
<i>(Bradyrhizobium japonicum</i> <i>USDA110</i>	Desconocido, bradyoxetina	Control de los genes <i>nod</i>	Brelles-Marino y Bedmar 2001) y Loh y Stacey (2003)

pTi: plásmido Ti, pNS: plásmido no simbiótico, C: cromosoma, p42a: plásmido 42a

Una de las características centrales de los sistemas de QS en los rizobios es su diversidad ya que, incluso dentro de la misma especie, no hay dos bacterias que posean el mismo conjunto de genes implicados en la regulación del QS. Parece probable que no exista pues un paradigma para los sistemas de QS dentro de los rizobios ya que en cada uno de ellos controla una función determinada.

La mayoría de los sistemas de señalización por sistemas de QS identificados hasta la fecha en los rizobios están basados en la síntesis y percepción de AHL (genes homólogos a *luxI* y *luxR*), ya que la ruta biosintética dependiente de LuxS que lleva a cabo la síntesis del AI-2 no está presente en los rizobios (Winzer *et al.*, 2002).

1.5.1.- *Rhizobium leguminosarum*

Dentro de *Rhizobium leguminosarum* se suelen distinguir tres biovariedades: *viciae*, que nodula el guisante, el haba y la lenteja; *trifolii*, que nodula el trébol y *phaseoli*, que nodula judías. La mayoría de las investigaciones realizadas hasta la fecha se han centrado en *R. leguminosarum* bv *viciae*. Esta bacteria posee al menos 4 genes de síntesis de AHL de tipo *luxI* y sus respectivos elementos reguladores (genes homólogos *luxR*) (Wisniewski-Die *et al.*, 2002) (Figura 1.16.).

1.5.1.1.- *cinI* y *cinR*

Los genes *cinI* y *cinR* están presentes en todas las estirpes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* analizadas hasta la fecha y se localizan en el cromosoma. CinR regula la expresión de *cinI* en respuesta a la 3-OH-C14:1-HSL sintetizada por la propia proteína CinI y parece haber coregulación de los genes adyacentes (Lithgow *et al.*, 2000). La mutación en cualquiera de los dos genes reduce la expresión del resto de sistemas de QS presentes en esta bacteria, lo que sugiere que el sistema *cinI/cinR* actúa como interruptor general del resto de los sistemas de QS (Rodelas *et al.*, 1999). Sin embargo, ambos mutantes crecen con normalidad en diferentes medios de cultivos y condiciones de crecimiento y no presentan anomalías durante la nodulación (Lithgow *et al.*, 2000). Se ha descrito, que la 3-OH-C14:1-HSL juega un papel en la adaptación a la fase estacionaria, ya que cuando se añade exógenamente aumenta la supervivencia en

condiciones de falta de nutrientes de cultivos que entran en fase estacionaria a baja densidad celular. Por lo tanto, los cambios fenotípicos asociados a las mutaciones deben ser relativamente sutiles y probablemente relacionados con la supervivencia y crecimiento en el suelo, en la rizosfera o incluso dentro de la planta (Thorne y Williams, 1999).

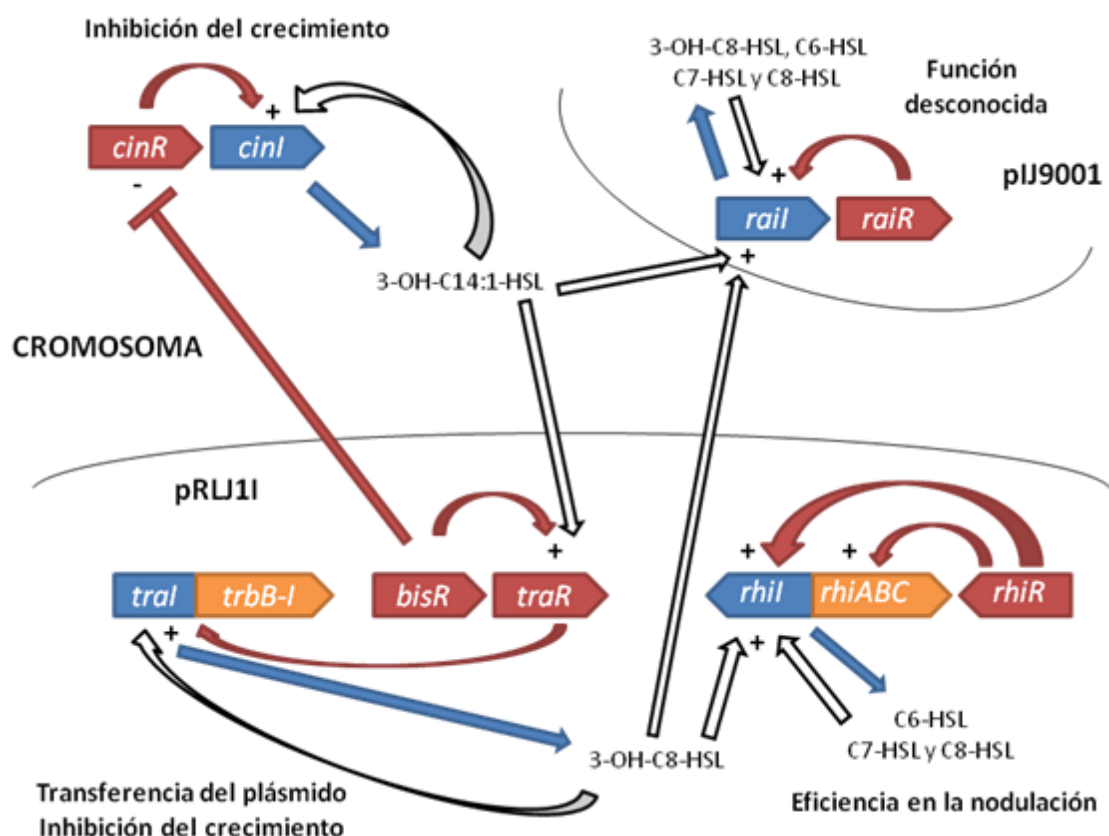


Figura 1.16. Sistemas de QS en *R. leguminosarum* bv *viciae*. Los genes del sistema *cin* residen en el cromosoma y controlan positivamente los sistemas *tra* y *rail*, a través de la 3-OH-C14:1-HSL. BisR por un lado inhibe la expresión de *cinR* y, por el otro, activa la transcripción del gen *traR*, conectando ambos sistemas. En el plásmido simbiótico pRLJ11 se encuentran los sistemas *tra* y *rhi*. El primero de ellos se activa por la 3-OH-C8-HSL y regula la transferencia del plásmido. El sistema *rhi* se activa por AHL de cadena corta y está implicado en la eficiencia de nodulación, aunque el mecanismo concreto se desconoce.

Además, en *R. leguminosarum* A34 se identificó a la 3-OH-C14:1-HSL como “bacteriocina pequeña”, que inhibía el crecimiento de estirpes sensibles. Además, esta

inhibición del crecimiento era máxima cuando se añaden otras dos AHL, la C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL (Wilkinson *et al.*, 2002).

1.5.1.2.- *raiI* y *raiR*

Los genes *raiI* y *raiR* están localizados en un plásmido de gran tamaño, no simbiótico, de la estirpe *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* 8002, pero no se ha detectado en ninguna de las bacterias de la especie *R. leguminosarum*, incluida la estirpe 3841, que está secuenciada (Lithgow *et al.*, 2000). Las mutaciones en estos genes no tienen un efecto significativo ni en el fenotipo durante la vida libre de la bacteria ni en el fenotipo simbiótico. RaiR regula la expresión del gen *raiI* en presencia de las AHL producidas por RaiI, la 3-OH-C8-HSL y C8-HSL. Hasta la fecha no se han identificado otros genes regulados por RaiR (Wisniewski-Die *et al.*, 2002).

1.5.1.3.- *rhiI* y *rhiR*

El gen *rhiR* está muy cercano a los genes de nodulación y por ello, fue uno de los primeros genes reguladores de los sistemas de QS en ser secuenciados. RhiR, en presencia de las AHL producidas por RhiI, la C6-HSL, C7-HSL y C8-HSL, activa la transcripción del gen *rhiI* y del operón *rhiABC*, que se expresa en la rizosfera (Rodelas *et al.*, 1999). La mutación en los genes *rhiR* o *rhiA* causa una disminución significativa en el número de nódulos durante la simbiosis. Sin embargo, no se conoce la función de los productos codificados por el operón *rhiABC*, pero el hecho de que se encuentre entre los genes de nodulación y los de fijación de la biovariedad *viciae* y no en el resto de *R. leguminosarum* indica que estos genes pueden estar implicados en la supervivencia o crecimiento de esta biovariedad con leguminosas hospedadoras específicas (Cubo *et al.*, 1992).

1.5.1.4.- *traI* y *traR*

TraR induce a *traI* en presencia de la 3-oxo-C8-HSL, AI sintetizado por TraI. Esta pareja de genes se localiza en el plásmido pRL1JI y, junto con *bisR*, que codifica otro

regulador de tipo LuxR, son necesarios para inducir los genes de transferencia del plásmido en *R. leguminosarum* A34. Sin embargo, en la biovariedad *viciae* estirpe 3841 no se han encontrado genes equivalentes en el plásmido simbiótico, pero sí en otros dos plásmidos pRL7JI y pRL8JI, aunque su papel en la transferencia de plásmidos no está demostrado (Wilkinson *et al.*, 2002; Danino *et al.*, 2002).

El modelo de regulación por QS de la transferencia de plásmidos se basa en el de *A. tumefaciens* (White y Winans, 2007). En este microorganismo, la transmisión del plásmido Ti permite la transferencia horizontal de caracteres de patogenicidad a otras estirpes que carecen de ellos. Los genes de transferencia del plásmido sólo se activan en presencia de opinas, unos compuestos nitrogenados producidos por la planta por inducción de la bacteria, cuando la densidad de población es la adecuada (Zhu *et al.*, 2000). Esto se consigue por la acción del regulador TraR, cuya transcripción se induce por opinas y se activa por la presencia de la AHL producida por TraI, la 3-oxo-C8-HSL. Al igual que en el caso del operón *lux*, el primer gen que se activa es el propio gen de síntesis de AHL (*traI*), por lo que se genera una retroalimentación positiva (Piper *et al.*, 1999). Para evitar una retroalimentación prematura, existe una proteína codificada por *traM*, que forma dímeros con el complejo TraI-AHL impidiendo la inducción de los operones de transferencia del plásmido. A altas densidades celulares, la cantidad de proteína TraM no es suficiente para bloquear a todos los complejos TraR-AHL, con lo que se inicia la retroalimentación positiva que desembocará en la transferencia del plásmido (Chen *et al.*, 2004).

Por lo tanto, parece evidente que los sistemas *tra* de QS presentes en los rizobios ejercen un control similar de transferencia de plásmidos al que ocurre en *A. tumefaciens*.

1.5.1.5.- Otros reguladores de tipo *luxR*

Además de lo descrito anteriormente, existen otros tres genes que codifican proteínas homólogas a LuxR en el genoma de *R. leguminosarum* 3841. De dos de ellos no se conoce su función, si bien del regulador transcripcional ExpR, cuyo gen está localizado en el cromosoma, se sabe que interviene, junto con la proteína CinS, en la coordinación de los sistemas *cin* y *rai* (Sanchez-Contreras *et al.*, 2007).

1.5.2.- *Rhizobium etli*

Al contrario que en *R. leguminosarum*, los sistemas de QS de *R. etli* están menos estudiados (dos estirpes han sido objeto de estudio, CNPAF512 y CFN42) y son mucho más sencillos. De hecho, CNPAF512, a pesar de producir más de 7 AHL diferentes, sólo tiene dos parejas de genes, el sistema *cin* y *rai*. La doble mutación en los genes *cinI* y *raiI* impide completamente la síntesis de todos los AI (Daniels *et al.*, 2002). (Figura 1.17.).

1.5.2.1.- *cinI* y *cinR*

Los genes *cinI* y *cinR* de *R. etli* CNPAF512 son similares a los descritos en *R. leguminosarum* bv. *viciae*. De hecho, la proteína CinI está implicada en la producción de una AHL de cadena larga que aún no está identificada (3-OH-cadena larga-HSL), que tiene propiedades similares a la 3-OH-C14:1-HSL, esto es, puede inhibir el crecimiento de estirpes de *R. leguminosarum* sensibles a la bacteriocina pequeña (Daniels *et al.*, 2002). Sin embargo, una diferencia significativa respecto a *R. leguminosarum* bv. *viciae* es que mutaciones en el gen *cinI* o *cinR* de *R. etli* causan una mayor fase de latencia y un crecimiento más lento, lo que se relaciona con un desarrollo anormal de los bacteroides en el nódulo (Daniels *et al.*, 2002). En el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae* la nodulación no se ve afectada ni en guisante ni en haba, pero en *R. etli*, la mutación en alguno de los dos genes desemboca en una reducción en la fijación de nitrógeno de más del 50 %. Se ha demostrado además, que el gen *cinI* se expresa durante la simbiosis, especialmente a lo largo del canal de infección y parece estar implicado en el desarrollo correcto del simbiosoma, puesto que el mutante *cinI* posee simbiosomas anormales (Daniels *et al.*, 2002).

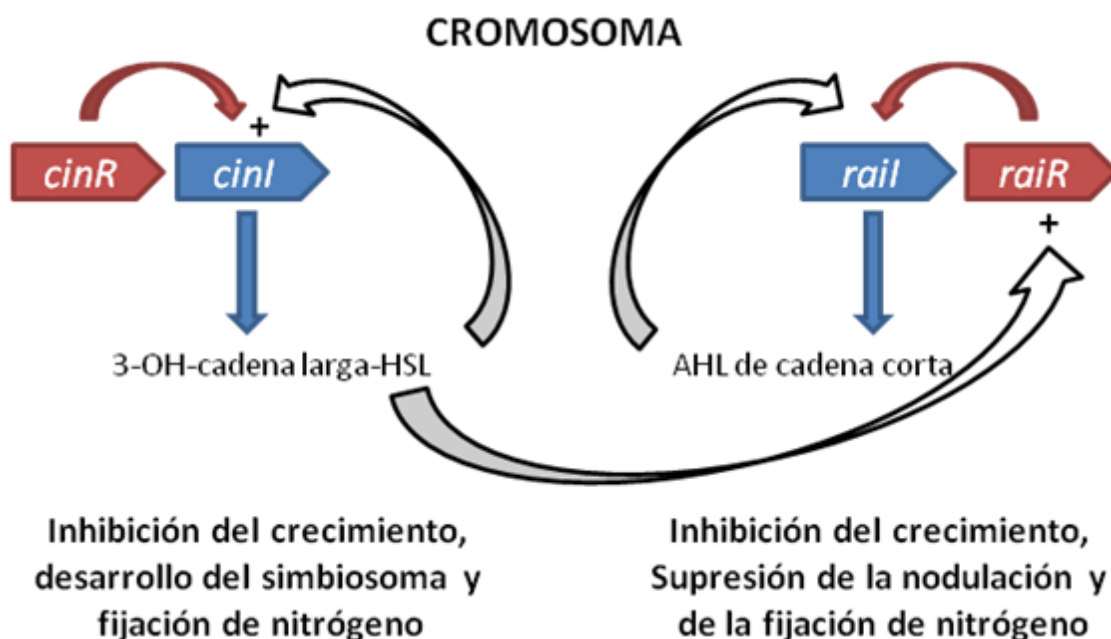


Figura 1.17. Sistemas de QS en *R. etli*. *R. etli* CNPAF512 tiene dos sistemas de QS bacteriano, el sistema *cin* y el *rai*, ambos localizados en el cromosoma de la bacteria. La AHL producida por la proteína de síntesis CinI regula a su vez positivamente la expresión del gen *raiR*. El sistema *cin* está implicado en la inhibición del crecimiento, en el desarrollo del simbiosoma y en la fijación de nitrógeno. Por el contrario, el sistema *rai*, además de inhibir también el crecimiento, suprime la nodulación y la fijación de nitrógeno.

1.5.2.2.- *raiI* y *raiR*

Los genes *raiI* y *raiR* se describieron por primera vez en la estirpe CNPAF512 y son ortólogos de los de *R. leguminosarum* bv. *viciae*. La proteína RaiI está implicada en la síntesis de AHL de cadena corta. El mutante *raiI* de *R. etli* produce un mayor número de nódulos y tiene mayor actividad nitrogenasa durante la simbiosis, si bien no se observó un aumento significativo en el crecimiento de las plantas respecto a la estirpe parental (Rosemeyer *et al.*, 1998). Por otro lado, mientras la mutación en *raiI* aumenta la nodulación, la mutación en *raiR* no tiene fenotipo simbiótico, por lo que parece que las AHL sintetizadas por RaiI están implicadas en la supresión de la nodulación. (Daniels *et al.*, 2002)

1.5.2.3.- *traI* y *traR*

La disposición de los genes de transferencia en el plásmido p42a de *R. etli* CFN42 es idéntica a los de pRL1JI de *R. leguminosarum* bv. *viciae* y, probablemente, ambos están regulados de manera similar al sistema *tra* de *A. tumefaciens* y están implicados en la transferencia del plásmido. La estirpe *R. etli* CNPAF512 no posee estos genes de QS (Sánchez-Contreras *et al.*, 2007).

1.5.3.- *Rhizobium* sp. NGR234

Rhizobium sp. NGR234 forma nódulos simbióticos, fijadores de nitrógeno en un amplio rango de leguminosas hospedadoras gracias, en gran parte, a las funciones presentes en el plásmido simbiótico pNGR234a. La secuenciación de este plásmido reveló la presencia de los genes *nod*, *fix* y *nif*, que dirigen las interacciones durante la simbiosis, y el sistema de QS *tra* (Freiberg *et al.*, 1997). Esta bacteria produce 3 AHL diferentes, la 3-oxo-C8-HSL, codificada por TraI y al menos una AHL de cadena corta y otra de cadena larga (He *et al.*, 2003). Se desconocen los genes de síntesis de AHL implicados en la producción de estos AI, pero es seguro que no se encuentran en pNGR234a, ya que las estirpes curadas de este plásmido siguen produciendo estas dos AHL (He *et al.*, 2003). Con la secuenciación de NGR234 (Schmeisser *et al.*, 2009) se detectó la presencia de un segundo sistema de QS en el cromosoma, formado por los genes *ngrI/R* (Figura 1.18.), que podría ser uno de los genes implicados en la producción de estas AHL.

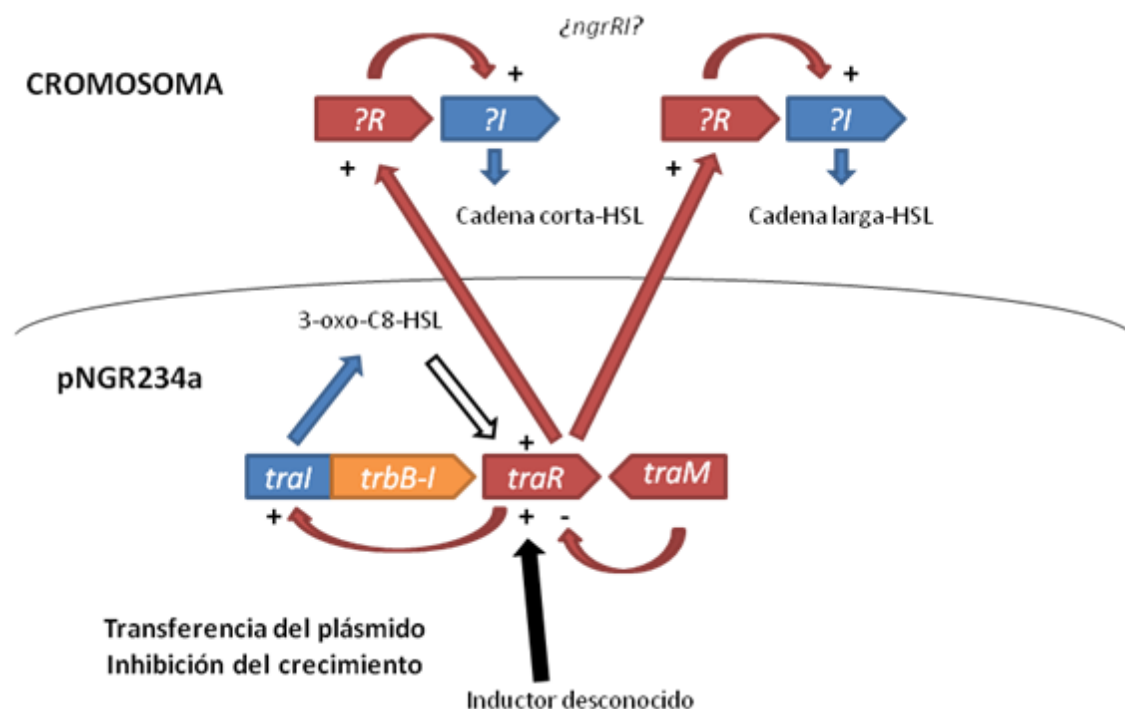


Figura 1.18. Sistemas de QS en *Rhizobium sp.* NGR234. Esta bacteria porta el plásmido simbiótico pNGR234, que posee los genes del sistema de QS *tra*. Este sistema produce la 3-oxo-C8-HSL y controla a través de TraR-AHL, la transferencia del plásmido. Sin embargo, la presencia de la proteína antiactivadora TraM, hace necesaria la presencia de un inductor, aún desconocido, que active la expresión de *traR*. Por otro lado, el complejo TraR-AHL potencia la producción de las otras AHL. No se conocen los genes de síntesis de las otras AHL detectadas, aunque probablemente, el sistema de QS *ngr* descubierto tras secuenciar el genoma de NGR234, sea uno de los implicados en la producción de estos AI.

1.5.3.1.- *traI* y *traR*

Es posible que la transferencia del plásmido simbiótico en NGR234 esté regulada por QS, ya que los genes *traI* y *traR* se localizan en él. Además de esta pareja de genes, también se ha encontrado el gen *traM*, que codifica para la proteína antiactivadora TraM. El sistema por lo tanto, podría parecerse al sistema *tra* de *A. tumefaciens*. Sin embargo, en condiciones de laboratorio, la transferencia del plásmido ocurre con muy baja frecuencia (He *et al.*, 2003), por lo que los autores sugieren que debe existir, como ocurre en *A. tumefaciens* con las opinas, un inductor del sistema *tra*. Parece claro sin embargo, que este sistema está implicado en la inhibición del crecimiento, ya que la adición externa de 3-oxo-C8-HSL a los cultivos ocasiona una reducción significativa en la tasa de crecimiento (He *et al.*, 2003). Por otro lado, la sobreexpresión de *traR* genera

una mayor producción de todos los AI producidos por esta bacteria, lo cual sugiere que el sistema *tra* controla al resto de sistemas de QS de NGR234.

1.5.3.2.- *ngrI* y *ngrR*

La secuenciación en 2009 del genoma de *Rhizobium sp.* NGR234, permitió la identificación de los genes *ngrI* y *ngrR* en el cromosoma. Hasta la fecha no se han llevado estudios sobre este sistema de QS de NGR234. En el trabajo de He *et al.* en 2003, se demostró que el mutante *tral* seguía produciendo una AHL de cadena corta y otra de cadena larga, por lo que se propuso la presencia de otros genes de síntesis de AHL. *ngrI* podría ser uno de estos genes.

1.5.4.- *Sinorhizobium meliloti*

La regulación por QS en *S. meliloti* ha sido estudiada en tres estirpes diferentes: Rm1021, Rm41 y AK631. Sin embargo, es en la estirpe 1021, que está secuenciada, donde más a fondo se han estudiado los sistemas de QS. La estirpe Rm1021 posee al menos dos sistemas de QS, *mel* y *sin*. La estirpe Rm41 porta, además, el sistema *tra* para la transferencia del plásmido simbiótico (Figura 1.19.) (Marketon *et al.*, 2002).

1.5.4.1.- *sinI* y *sinR*

La proteína SinI es responsable de la síntesis de varias AHL de cadena larga, desde la C12-HSL hasta la C18-HSL. La mutación del gen *sinI* determina un retraso en la aparición de nódulos, así como un descenso en la cantidad de nódulos fijadores de nitrógeno, lo que sugiere que este sistema puede estar implicado en la simbiosis con *Medicago sativa* (Marketon *et al.*, 2002). Se ha demostrado que el sistema *sinI/R* es necesario para la producción del EPSII, un polisacárido superficial que juega un papel importante durante la simbiosis. Sin embargo, para la producción de EPSII es necesaria la proteína reguladora ExpR, que se activa por la presencia de C16:1-HSL, producida por SinI. ExpR es un regulador positivo de los genes *exp*, implicados en la síntesis del EPSII (Marketon *et al.*, 2003). Parece, por lo tanto, que la mutación en *sinI* impide la

activación de la producción del EPSII, ya que la AHL que activa a la proteína reguladora ExpR deja de producirse. Esto tiene como consecuencia el retraso en la formación de nódulos y la pérdida de la capacidad de fijación de nitrógeno de los mismos.

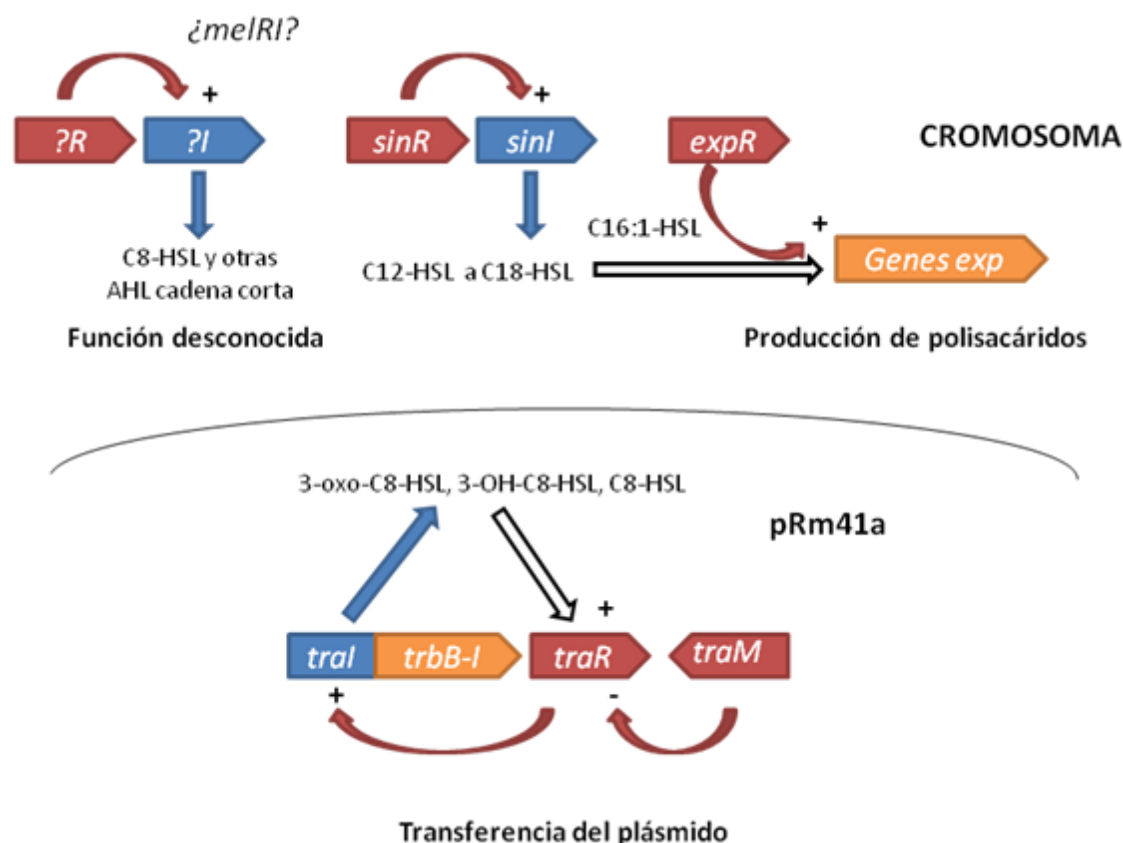


Figura 1.19. Sistemas de QS en *Sinorhizobium meliloti*. La estirpe de *S. meliloti* Rm41 posee tres sistemas de QS, mientras que la estirpe Rm1021 sólo posee dos, ya que no tiene el plásmido pRm41a y, por lo tanto, no tiene el sistema *tra*. Este sistema, especialmente a través de la 3-oxo-C8-HSL regula la transferencia del plásmido. El sistema *sin* está en el cromosoma de ambas estirpes y está implicado en la regulación de la producción del exopolisacarido II (EPSII), de gran importancia en la simbiosis. En esta activación se requiere la presencia de la C16:1-HSL y de otro regulador, ExpR. Ambas bacterias sintetizan, además, AHL de cadena corta, pero los genes correspondientes aun no han sido identificados.

1.5.4.2.- Sistema *mel*

La mutación en el gen de síntesis de AHL del sistema *sin*, impide la producción de las AHL de cadena larga, pero no así la producción de las AHL de cadena corta. Por lo tanto, se ha propuesto la existencia de un segundo sistema de QS, que se ha denominado

mel, responsable de la síntesis de estos AI (Marketon *et al.*, 2002). Sin embargo, el análisis del genoma de Rm1021 no mostró la presencia de más genes de síntesis de AHL de tipo *luxI*, si bien, sí que se ha encontrado un homólogo a la proteína de síntesis de AHL HtdS de *P. fluorescens*. Sin embargo, la implicación de esta proteína en la producción de AHL de cadena corta no está demostrada.

1.5.4.3.- *traI* y *traR*

Mientras que en la estirpe Rm1021 no existe el sistema *tra*, la estirpe Rm41 sí que posee un sistema de QS *tra* muy similar al que está presente en *A. tumefaciens* y en *Rhizobium* sp. NG234, ya que posee los genes *traI*, *traR*, *traM* y el operón para la transferencia del pRm41a (Gonzalez y Marketon, 2003).

1.5.5.- *Bradyrhizobium japonicum*

Todos los rizobios descritos hasta la fecha usan AHL como moléculas de comunicación intercelular. La excepción es *B. japonicum* que usa como molécula autoinductora la bradyoxetina. La bradyoxetina está implicada en la represión de los genes *nod* a altas densidades poblacionales de la bacteria. La síntesis de este AI está favorecida por condiciones de déficit en hierro soluble y, de hecho la estructura química de este AI es similar a la de ciertos antibióticos y sideróforos (Loh *et al.*, 2002).

1.6.- Interferencia en los sistemas de QS bacteriano

La expresión coordinada de genes implicados en virulencia, colonización y simbiosis es crucial en la interacción bacteria-hospedador (Crespi y Galvez, 2000). En el caso de los patógenos es especialmente importante no activar genes implicados en la virulencia, ya que éstos pueden inducir en el hospedador una respuesta defensiva temprana ante la presencia de la bacteria, lo cual supone una clara ventaja para el hospedador ante una población bacteriana poco desarrollada (Zhang, 2003).

Los eucariotas, incluidas las plantas, pueden producir diferentes moléculas que interfieren con los sistemas de QS bacteriano (IQS) (Gao *et al.* 2003). Entre las moléculas implicadas en la IQS bacteriano están aquellas que mimetizan a los AI en estructura y/o función, aquellos que antagonizan los AI (Teplitski *et al.* 2000) e incluso aquellos que interfieren con las AI sintetas o los reguladores de la percepción del quórum (Keshavan *et al.* 2005).

1.6.1.- Furanonas halogenadas

El alga roja *Delisea pulchra* produce de forma natural las furanonas halogenadas. Estas moléculas poseen un enorme parecido estructural con las AHL de bacterias (Figura 1.20.) y, de hecho, se ha demostrado que pueden interferir en ciertos procesos regulados mediante QS bacteriano (Manefield *et al.*, 1999). Una de las bacterias sobre la que interfieren las furanonas halogenadas es *Serratia liquefaciens*, que regula su movilidad tipo swarming mediante el sistema de QS *swr*, homólogo al sistema *lux* de *V. fischeri* (Daniels *et al.* 2004). Mediante estudios *in vitro* se ha demostrado que las furanonas halogenadas se unen al elemento regulador SwrR y promueven la rápida degradación de esta proteína. Sin embargo, este fenómeno se inhibe si previo a la adición de la furanona se añade la AHL adecuada (Manefield *et al.* 2002).

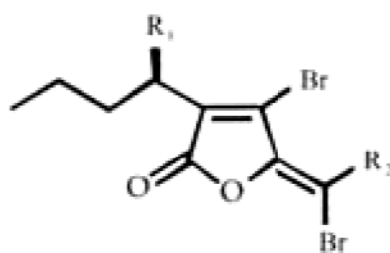


Figura 1.20. Estructura química de las furanonas halogenadas. Las furanonas halogenadas se consideran moléculas miméticas estructurales por su similitud en la estructura química con las AHL.

Además de en *S. liquefaciens*, las furanonas halogenadas interfieren en *E. coli* en los sistemas de QS basados en el AI-2, inhibiendo completamente la movilidad tipo swarming y reduciendo significativamente la formación de biofilm (Ren *et al.*, 2001). De hecho, estudios con microarray llevados a cabo en esta bacteria a la que se añadió

AI-2 o furanonas halogenadas mostraron que 44 genes implicados en quimiotaxis, movilidad y síntesis de flagelos se activaban por el AI-2 y se inhibían en presencia de las furanonas halogenadas (Ren *et al.*, 2005).

1.6.2.- L-canavanina

La L-canavanina (Figura 1.21.) es un aminoácido derivado de la arginina que se encuentra exclusivamente en las semillas de leguminosas y, de hecho, en algunas de ellas puede suponer el 5% del peso seco de la semilla (Weaks, 1977). Además de servir como fuente de nitrógeno para las semillas durante la germinación, la L-canavanina puede inhibir el crecimiento de ciertas bacterias además de tener efecto insecticida, ya que se incorpora en la síntesis de proteínas en lugar de la L-arginina y genera proteínas alteradas (Rosental, 2001).

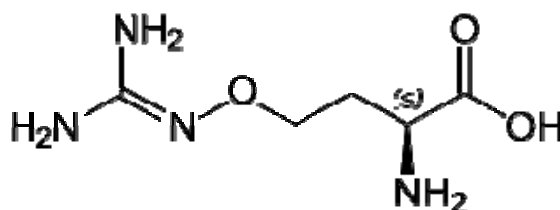


Figura 1.21. Estructura química de la L-canavanina. Esta molécula es un derivado del aminoácido L-arginina.

Sin embargo, Keshavan *et al.* (2005) demostraron que este derivado de aminoácido interfiere también en los sistemas de QS del biosensor *C. violaceum* CV026 y esta interferencia es independiente del efecto en el crecimiento. Además, la presencia de esta molécula en cultivos de *S. meliloti* es suficiente para inhibir la producción de EPSII, regulada por QS.

1.6.3.- Opinas

A. tumefaciens es una bacteria que causa tumores en cientos de dicotiledóneas (Escobar y Dandekar, 2003). Esta capacidad patogénica reside en su plásmido Ti, que tiene los genes de virulencia y, además, parte de su ADN (ADN_T) se puede transferir al

interior del núcleo de la célula vegetal. Este ADN induce a la célula vegetal a sintetizar unos tipos de derivados de aminoácidos, las opinas (Figura 1.22.), que son consumidos por la bacteria en el tumor (Zhu *et al.*, 2000). Este plásmido, entre las diferentes especies de *A. tumefaciens*, es transferido por conjugación mediante el sistema de QS *tra*. Sin embargo, la proteína TraR, incluso cuando la población de la bacteria alcanza la densidad óptica adecuada, no es activa ya que está unida a la proteína antiactivadora TraM. En esas condiciones, la expresión de *traR* se incrementa únicamente en presencia de ciertas opinas, y la cantidad de proteína TraM no es suficiente para bloquear a toda la proteína TraR, por lo que se activan los sistemas de QS y se inicia la transferencia del plásmido (Oger y Farrand, 2001; Oger y Farrand, 2002) (Piper *et al.*, 1999). Al menos existen dos tipos de opinas que activan la expresión del gen *traR*, la nopalina y la octopina, y cada una de ellas, mediante rutas diferentes, incrementa la cantidad de proteína TraR (Oger y Farrand, 2002).

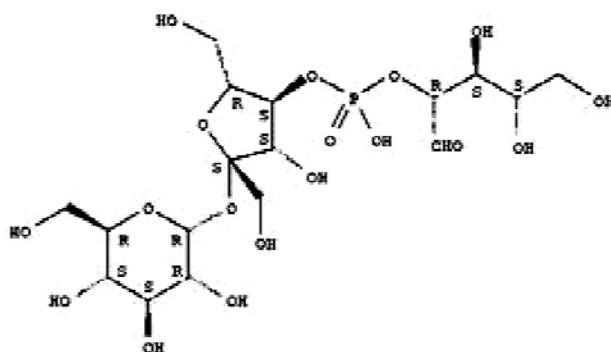


Figura 1.22. Estructura química de las opinas. Las opinas son derivados de aminoácidos producidos por la planta inducidos por la bacteria. Existen diferentes tipos de opinas. La estructura que se muestra es de la agropinopina B, una de las opinas que incrementa la expresión del gen *traR*.

1.6.4.- Flavonoides

Recientemente, en el trabajo de Vandeputte *et al.* (2010), se ha identificado un flavonoide como molécula que interfiere en los sistemas del QS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que controlan la producción de factores de virulencia mediante QS. En ese trabajo se obtuvieron extractos de hojas y corteza de *Combretum albiflorum* (Tul.) Jongkind y se comprobó que reducían la producción de factores dependientes de QS esta bacteria. El fraccionamiento de los extractos y su análisis permitió identificar a

un flavonoide como una de las moléculas que interferían en los sistemas de QS, la flavan-3-ol catequina. Se comprobó, además, que la catequina purificada provocaba un descenso en la producción de piocianina y elastasa, factores de virulencia de esta bacteria, así como en la formación de biofilm. Todos estos procesos están regulados mediante sistemas de QS y, de hecho, la presencia del flavonoide inhibe la expresión de las parejas de genes *las* y *rhl* (Figura 1.23.).

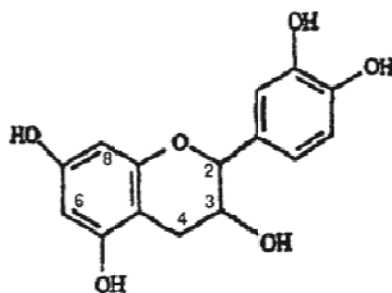


Figura 1.23. Estructura química de la flavan-3-ol catequina. Este flavonoide producido por la planta *Combretum albiflorum* (Tul.) Jongkind inhibe la producción de factores de virulencia de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 mediante la inhibición de los sistemas de QS bacteriano.

1.6.5.- Hormonas humanas

El cuerpo humano puede también interferir con los sistemas de QS bacteriano. En *E. coli* EHEC el sistema de QS dependiente de LuxS controla diferentes fenotipos como, por ejemplo la patogenicidad y la secreción de proteínas a través del sistema de secreción de tipo III, que son básicos en la virulencia ante células epiteliales HeLa (Sircilli *et al.*, 2004). Sorprendentemente, los fenotipos de patogenicidad y secreción de proteínas se restauraron en una estirpe mutante *luxS* con las hormonas adrenalina y noradrenalina (Sperandio *et al.*, 2003). Además, el tratamiento con antagonistas de los receptores adrenérgicos bloqueó la activación del mutante *luxS* por las hormonas humanas. (Figura 1.24.).

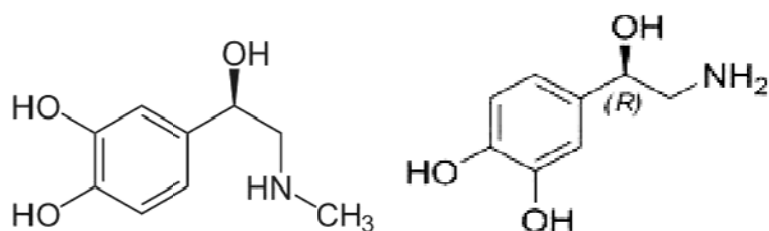


Figura 1.24. Estructura química de la adrenalina y noradrenalina. Estas hormonas humanas activan los sistemas de QS de *E. coli* EHEC. Derecha: adrenalina. Izquierda: noradrenalina.

1.6.6.- Otros compuestos que interfieren en los sistemas de QS

En 2000, Tepliski *et al.*, descubrieron varias moléculas de plantas superiores a las que denominaron AHL-mimic que activaban la expresión de varios genes regulados mediante QS. A pesar de no identificar químicamente a estas moléculas, constataron que la naturaleza química de las mismas era diferente según la planta que las produjese. Así, las semillas de guisante (*Pisum sativum*) y sus exudados contenían compuestos que inhibían la producción de violaceína en *C. violaceum*, un fenotipo regulado mediante QS. Además, otros fenotipos regulados por QS en esta bacteria, como son las actividades proteasa y exoquitinasa, fueron inhibidos sustancialmente en presencia de exudados de semillas. Estos exudados, además, activaban varios fenotipos regulados por QS de otros biosensores basados en diferentes elementos reguladores de tipo LuxR, como AhvR de *Aeromonas hydrophila* o LasR de *P. aeruginosa*.

Otros estudios llevados a cabo en *Medicago truncatula* indicaron que, en semillas y exudados de semilla de esta planta, existen entre 15 o 20 compuestos diferentes que activan o inhiben específicamente fenotipos regulados mediante QS en diferentes biosensores bacterianos basados en varios reguladores de tipo LuxR. Los biosensores basados en los reguladores CepR (*P. putida*), LasR (*P. aeruginosa*) y LuxR (*V. fischeri*) fueron activados en presencia de extractos de exudados de semilla. Otros extractos de semilla, inhibieron a biosensores basados en los reguladores CviR (*C. violaceum*), AhvR (*A. hydrophila*), LasR (*P. aeruginosa*) y LuxR (*V. fischeri*) (Gao *et al.*, 2003).

En 2007, en el trabajo de Degrassi *et al.* se describió la presencia en hojas y semillas de arroz de, al menos, dos moléculas que inducen a tres biosensores diferentes y que, además, son susceptibles del ataque de la enzima lactonasa, por lo que los autores discuten sobre el posible origen bacteriano (bacterias endosimbiontes) de estas moléculas.

Chamydomonas reinhardtii, un alga unicelular, produce más de una docena de compuestos capaces de interferir, mediante activación, en los sistemas de QS de biosensores basados en LasR o CepR, pero no en los basados en LuxR, AhyR o CviR. Uno de estos compuestos se usó para estudiar el efecto sobre *S. meliloti*, encontrándose que muchos de los genes regulados mediante QS se veían afectados en su expresión (Tepliski *et al.*, 2004).

Además, mediante la construcción de dos biosensores que detectan moléculas que inhiben el QS, se identificaron moléculas que inhiben los sistemas de QS en extractos de varias plantas medicinales del sur de Florida (*Conocarpus erectus*, *Chamaesyce hypericifolia*, *Callistemon viminalis*, *Bucidabuceras*, *Tetrazygia bicolor* y *Quercus virginiana*) (Adonizio *et al.*, 2008), y también en extractos de ajo (Bjarnsholt *et al.*, 2005). En otro estudio, mediante el uso de estos biosensores, se identificaron inhibidores del QS producidos por hongos pertenecientes al género *Penicillium*. Dos de estos inhibidores se caracterizaron químicamente, el ácido penicílico y la patulina. De hecho, se demostró que la patulina, como las furanonas halogenadas, promovía la rápida degradación de la proteína de tipo LuxR de *P. aeruginosa* y hacía más sensible ante el tratamiento con antibióticos a los biofilm de esta bacteria (Figura 1.25.).

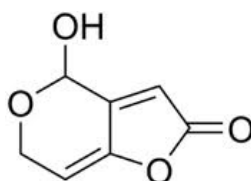


Figura 1.25. Estructura química de la patulina. Esta molécula, producida por *Penicillium*, promueve la rápida degradación de las proteínas de tipo LuxR.

OBJETIVOS

Para el estudio de los sistemas de QS en los rizobios, así como para conocer su importancia durante el diálogo molecular que se establece durante la simbiosis, se han planteado los siguientes objetivos:

- Caracterización de los sistemas de QS de *Sinorhizobium fredii* SMH12, *Rhizobium etli* ISP42 y *Rhizobium sllae* IS123.
- Influencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación en los sistemas de QS de las tres bacterias de estudio.
- Papel de los sistemas de QS en la simbiosis de *Sinorhizobium fredii* SMH12 con *Glycine max* cv Osumi.
- Interferencia en los sistemas de QS bacteriano por plantas de *Oryza sativa* cv Puntal y *Phaseolus vulgaris* cv BBL.

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- Bacterias, plásmidos y medios de cultivo

3.1.1.- Bacterias y plásmidos

Las estirpes bacterianas y los plásmidos utilizados en esta Tesis se recogen en la siguiente Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Bacterias y plásmidos utilizados.

Estirpe	Características relevantes	Referencia
<i>Sinorhizobium fredii</i>		
SMH12	Estirpe silvestre, Ap ^R	Rodríguez-Navarro <i>et al.</i> 2003
SMH12 (pMP240)	SMH12 con el plásmido pMP240, portador del promotor del gen <i>nodA</i> fusionado a <i>lacZ</i> , Tc ^R	Dardanelli <i>et al.</i> 2010
SMH12 (pME6863)	SMH12 con el plásmido pME6863, portador del gen que codifica la proteína lactonasa, Tc ^R	Esta Tesis
SMH12 (pMP2463)	SMH12 con el plásmido pMP2463, portador del gen que codifica la proteína fluorescente verde, Gm ^R	Esta Tesis
SMH12 (pMP6863) (pMP2463)	SMH12 con los plásmidos pME6863 y pMP2463, portadores de los genes que codifican la proteína lactonasa y la proteína fluorescente verde, respectivamente, Tc ^R Gm ^R	Esta Tesis
SVQ646	SMH12 <i>tral::lacZ</i> -Gm ^R	Esta Tesis
SVQ646 (pMP2463)	SVQ646 con el plásmido pMP2463, portador del gen que codifica la proteína fluorescente verde, Gm ^R	Esta Tesis
SVQ648	SMH12 <i>nodDI::lacZ</i> -Gm ^R	Esta Tesis
SVQ648 (pMP2463)	SVQ648 con el plásmido pMP2463, portador del gen que codifica la proteína fluorescente verde, Gm ^R	Esta Tesis
<i>Rhizobium etli</i>		
ISP42	Estirpe silvestre	Rodríguez-Navarro <i>et al.</i> 2000
SVQ612	ISP42, Rif ^R	Esta Tesis

ISP42(pMP240)	ISP42 con el plásmido pMP240, portador del promotor del gen <i>nodA</i> fusionado a <i>lacZ</i> , Tc ^R	Dardanelli <i>et al.</i> 2008
SVQ664	ISP42 Rif ^R <i>raiI</i> :: Ω, Spc ^R	Esta Tesis
SVQ612 (pME6863)	ISP42 Rif ^R con el plásmido pME6863, portador del gen que codifica la proteína lactonasa, Tc ^R	Esta Tesis
<i>Rhizobium sllae</i>		
IS123	Estirpe silvestre	Espuny <i>et al.</i> 1987
IS123 (pMP240)	IS123 con el plásmido pMP240, portador del promotor del gen <i>nodA</i> fusionado a <i>lacZ</i> , Tc ^R	Pérez-Montaña <i>et al.</i> 2011
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	<i>SupE44</i> , <i>ΔlacU169</i> , <i>5hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i> , Nx ^R	Sambrook <i>et al.</i> 1989
Estirpes biosensoras		
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 (pZRL4)	<i>A.tumefaciens</i> curada del plásmido pTiC58; con el plásmido pZRL4, portador de la fusión <i>traG::lacZ</i> y del gen <i>traR</i> , Gm ^R	Cha <i>et al.</i> 1998
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1 (pZRL4) (pME6863)	<i>A.tumefaciens</i> NT1(pZRL4) con el plásmido pME6863, portador del gen que codifica la proteína lactonasa, Gm ^R , Tc ^R	Esta Tesis
<i>E. coli</i> JM109 (pSB536)	<i>E. coli</i> con el plásmido pSB536, portador de la construcción <i>ahyR-pahyI::luxCDABE</i> , Tc ^R	Swift <i>et al.</i> 1997
<i>E. coli</i> JM109 (pSB536) (pME6863)	<i>E. coli</i> JM109 (pSB536) con el plásmido pME6863, portador del gen que codifica la proteína lactonasa, Tc ^R	Esta Tesis
<i>Chroombacterium violaceum</i> CV026	<i>C.violaceum</i> <i>cviI::mini-Tn5</i>	McClellan <i>et al.</i> 1997
Plásmido	Características relevantes	Referencia
pGEM-T Easy	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^R	Promega
pMBL-T Vector	Vector de clonación de productos de PCR, Ap ^R	MBL dominion
pAB2001	Plásmido que contiene el cassette <i>lacZ</i> -Gm ^R , Ap ^R , Gm ^R	Becker <i>et al.</i> , 1995

pHP45Ω	Plásmido que contiene el interposón Ω, Spc ^R /Str ^R , Ap ^R	Prentki y Krisch, 1984
pK18mob	Vector de clonación (suicida en los rizobios), Km ^R	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pMP92	Vector de clonación de amplio rango de hospedador IncP, Tc ^R	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP240	Plásmido pMP92 que contiene el promotor del gen <i>nodA</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv <i>viceae</i> fusionado al gen <i>lacZ</i> , Tc ^R	De Maagd <i>et al.</i> , 1988
pBBR-MCS-5	Vector de expresión de amplio rango de hospedador, Gm ^R	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pME6863	pME6000:: <i>aiiA</i> , plásmido que contiene el gen que codifica la proteína lactonasa, Tc ^R	Reimann <i>et al.</i> , 2002
pMP2463	pBBR-MCS-5:: <i>egfp-1</i> , plásmido que contiene el gen que codifica la proteína fluorescente verde, Gm ^R	Stuurman <i>et al.</i> , 2000
pRK2013	Plásmido ayudador, Km ^R	Figurski y Helinski, 1979
pMUS534	Plásmido pK18mob que contiene un fragmento <i>Hind</i> III de ~6 kb procedente de un plásmido que porta la fusión <i>nodD1::lacZ</i> -Gm ^R (gen <i>nodD1</i> procedente de HH103)	Vinardell <i>et al.</i> , 2004
pMUS977	Plásmido pMBL-T Vector que porta un fragmento de PCR de ~1,2 kb que contiene el gen <i>trai</i> de SMH12	Esta tesis
pMUS979	Plásmido pMBL-T Vector que porta un fragmento de PCR de ~1kb que contiene el gen <i>rail</i> de ISP42	Esta tesis
pMUS989	Plásmido pK18mob que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI <i>Hind</i> III de ~1,2 kb procedente de pMUS977	Esta tesis
pMUS994	Plásmido pK18mob que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI <i>Hind</i> III de ~1 kb procedente de pMUS979	Esta tesis
pMUS996	pMUS994 con el interposón Ω inserto en un punto <i>Bam</i> HI del gen <i>rail</i>	Esta tesis
pMUS1009	pMUS989 con el cassette <i>lacZ</i> -Gm ^R inserto en un punto <i>Ale</i> I (romo) del gen <i>trai</i>	Esta tesis
pMUS1033	Plásmido pMBL-T Vector que porta un fragmento de PCR de ~1 kb que contiene el	Esta tesis

gen *cinI* de ISP42

pMUS1042	Plásmido pK18mob que contiene un fragmento <i>Bam</i> HI <i>Hind</i> III de ~1kb procedente de pMUS1033	Esta Tesis
pMUS1044	pMUS1042 con el interposón Ω inserto en un punto <i>Cla</i> I del gen <i>cinI</i>	Esta Tesis
pMUS1063	Plásmido pBBR-MCS-5 que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI <i>hind</i> III de ~1 kb procedente de pMUS1033	Esta tesis
pMUS1064	Plásmido pBBR-MCS-5 que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI <i>Xho</i> I de ~1 kb procedente de pMUS977	Esta tesis
pMUS1071	Plásmido pBBR-MCS-5 que contiene un fragmento <i>Eco</i> RI <i>Sac</i> I de ~1 kb procedente de pMUS979	Esta tesis
pMUS1099	Plásmido pGEM-T Easy que porta un fragmento de PCR de ~1,2 kb que contiene el gen <i>trai</i> (2) de SMH12	Esta tesis

Ap: ampicilina, Gm: gentamicina, Km: kanamicina, Nx: ácido nalidíxico, Spc: espectinomicina, Str: estreptomycin, Tc: tetraciclina.

3.1.2.- Medios de cultivo para *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium*

Las estirpes de *Sinorhizobium*, *Rhizobium* y *Agrobacterium* se cultivaron en los medios que se detallan a continuación. Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. En ambos casos la temperatura de incubación fue de 28 °C.

Medio TY (Behringer, 1974)

Extracto de levadura	3 g
Triptona	5 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,65 g
H ₂ O	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

Medio YM (Vincent, 1970)

K ₂ HPO ₄	500 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	200 mg
NaCl	100 mg
Extracto de levadura	400 mg
Manitol	10 g / 3 g
H ₂ O	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

El medio YM se usó tanto con 10 gramos de manitol por litro como con 3 gramos de manitol por litro de medio, según el experimento llevado a cabo.

Medio MGM bajo en fosfato (100 µM) (Rinaudi y Giordano, 2010)

Ácido Morfolinopropansulfónico (MOPS)	10,46 g
Manitol	10 g
H ₂ O	Añadir hasta los 800 ml aproximadamente

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). Se preparan por separado las siguientes soluciones, que se esterizaron en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

CaCl ₂ 0,5 M	100 µl
MgSO ₄ 0,1 M	10 ml
Biotina 0,4 mM	2 ml
Glutamato sódico 380 mM	10 ml
K ₂ HPO ₄ - KH ₂ PO ₄ 100 mM	200 µl
H ₂ O estéril	Completar hasta 1 L

3.1.3.- Medios de cultivo para *Escherichia coli* y *Chromobacterium violaceum* CV026

Para cultivar las estirpes de *E. coli* y el biosensor *C. violaceum* CV026 se utilizó el medio rico de Luria-Bertani (LB). Los cultivos líquidos se incubaron en agitación a 180 r.p.m. Los medios se solidificaron, cuando fue necesario, añadiendo 20 g L⁻¹ de agar. La temperatura de incubación fue de 37 °C para las estirpes de *E.coli* y de 28 °C en el caso de CV026.

LB (Maniatis *et al.*, 1982).

Extracto de levadura	5 g
Triptona	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O	Completar hasta 1 L

El pH se ajustó a 6,8-7,0 y el medio se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C).

3.1.4.- Agentes selectivos e identificativos

Para la selección e identificación de las diferentes estirpes bacterianas y plásmidos se utilizaron los siguientes agentes selectivos, suministrados por Sigma, a las concentraciones indicadas:

Antibiótico	Solución stock (mg mL⁻¹)	<i>S. fredii</i> SMH12 (µg mL⁻¹)	<i>R. etli</i> ISP42 (µg mL⁻¹)	<i>E. coli</i> (µg mL⁻¹)
Ampicilina (Ap)	100	-	-	100
Espectinomicina (Spc)	50	50	50	100
Gentamicina (Gm)	50	5	5	10
Kanamicina (Km) ¹	30	120	30	30
Ácido nalidíxico (Nal) ³	10	-	-	20
Rifampicina (Rif)	25	50	50	25
Tetraciclina (Tc) ²	10	2	5	10
X-gal	20	40	40	40

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

La rifampicina¹ se disolvió en metanol, la tetraciclina² en etanol al 70% y el ácido nalidíxico³ en una solución de NaOH 0,1M. Los demás antibióticos se disolvieron en agua. La temperatura de almacenamiento de los antibióticos fue de -20 °C.

El X-gal, suministrado por Roche, se disolvió en N, N-dimetilformamida (20 mg mL⁻¹) y también se conservó a -20 °C.

3.1.5.- Flavonoides

Los flavonoides, suministrados por Sigma Aldrich, se prepararon a una concentración de 1 mg mL⁻¹ en etanol absoluto y se añadieron a los cultivos para alcanzar una

concentración final de aproximadamente 3,7 μ M. La temperatura de almacenamiento fue de -20 °C.

Se utilizaron 9 flavonoides para la inducción de las estirpes: una flavanona (naringenina), dos flavonoles (morina, y quercetina), dos isoflavonas (genisteína y daidzeína), dos flavonas (7, 4'-dihydroxiflavona y apigenina), una chalcona (isoliquiritigenina) y una coumarina (umbeliferona).

3.1.6.- Medidas de pH y espectrofotométricas

El pH de las soluciones se midió con un pH-metro modelo pH-meter BASIC 20+ (Crison). Para realizar las medidas espectrofotométricas se empleó el espectrofotómetro Novaspec II (Pharmacia LKB).

3.1.7.- Solución de congelación

Se utilizó para conservar las estirpes bacterianas durante largos periodos de tiempo. Tras cultivar las bacterias en los medios apropiados, la biomasa procedente de 5 mL de cultivo se resuspendió en 1,5 mL de una solución compuesta de peptona al 0,5% (m/v) y de glicerol al 15% (v/v) esterilizada en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). Las bacterias así preparadas se conservaron a -80 °C.

3.2.- Técnicas microbiológicas

3.2.1.- Métodos de transferencia de ADN entre bacterias

3.2.1.1.- Conjugación

Se utilizó para transferir plásmidos desde distintas estirpes de *E. coli* a *Sinorhizobium* y *Rhizobium*. Para ello se mezclaron en un tubo eppendorf, 800 μ L de cultivo de las estirpes de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* receptoras cultivadas en agitación durante 48 horas, con 200 μ L de cultivo en fase logarítmica de las estirpes de *E. coli* donadoras de los plásmidos, cultivadas en condiciones estáticas durante 24 horas. Cuando fue

necesario, se añadieron 100 μ L de cultivo de la estirpe de *E. coli* portadora del plásmido pRK2013, también en fase logarítmica y cultivada en condiciones estáticas (24 horas), que actuó como coadyuvante en la transferencia de los plásmidos.

Esta mezcla se centrifugó durante 5 minutos a 13000 r.p.m. El sobrenadante se retiró con cuidado y las células se resuspendieron con una pipeta en 100 μ L de agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron como una gota o un parche en una placa con medio TY y se incubaron a 28 °C durante 24 horas. La masa celular desarrollada se recogió y se resuspendió en 1-2 mL de glicerol-peptona. Posteriormente se realizaron las diluciones apropiadas para sembrar placas de TY o YMA con los antibióticos adecuados y así seleccionar las estirpes transconjugantes. Las colonias desarrolladas se purificaron por sucesivas siembras en el mismo medio selectivo.

La masa celular resuspendida en glicerol-peptona se conservó, cuando fue necesario, a -20 °C.

3.2.1.2.- Transformación de *Escherichia coli*

Se siguió el método del TSS (del inglés Transformation and Storage Solution) descrito por Chung *et al.* (1989). Se inocularon tubos con 3 mL de LB líquido con un cultivo de la estirpe de *E. coli* crecida en medio LB líquido suplementado con los antibióticos adecuados. Cuando la densidad óptica a 600 nm fue de 0,3-0,4, se transfirió 1 mL de cultivo a un tubo eppendorf, que se mantuvo durante 5 minutos en hielo, y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto. Las células se resuspendieron en 75 μ L de LB estéril frío y se mantuvieron durante 5 minutos en hielo. Posteriormente, se añadieron otros 75 μ L de TSS 2X frío, se mezcló todo suavemente y se mantuvo de nuevo la mezcla durante 5 minutos en hielo. De esta manera se obtuvieron células competentes de forma rápida inmediatamente antes de realizar la transformación. El ADN plasmídico que se quería transferir se añadió a las células competentes y la mezcla se mantuvo en hielo durante al menos otros 30 minutos. A continuación, las células se sometieron a un choque térmico (42 °C durante 1 minuto y 5 minutos en hielo) para permitir la entrada del ADN plasmídico en la célula. Finalmente se añadió 1 mL de LB y se incubó a 37 °C durante 1 hora.

Los transformantes se seleccionaron sembrando la transformación en placas de LB suplementadas con los antibióticos adecuados.

Cuando el plásmido transferido portaba el gen de resistencia a la gentamicina, después de incubar la mezcla de transformación en 1 mL de LB a 37 °C durante 1 hora, se le añadió gentamicina a una concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y se incubó a la misma temperatura otra hora más antes de seleccionar las células transformantes a la concentración de gentamicina adecuada.

Soluciones empleadas:

TSS 2X	Tryptona 0,8 g, extracto de levadura 0,5 g, NaCl 0,5 g, polietilenglicol 20 g, 10 mL DMSO (dimetil sulfóxido), 10 mL MgSO_4 1M. Completar con agua destilada hasta 100 mL. Ajustar el pH a 6,5.
--------	--

3.2.2.- Determinación de la actividad β -galactosidasa

Se realizaron ensayos de la actividad β -galactosidasa con tres objetivos diferentes: **I)** determinar la capacidad de inducción de diferentes flavonoides sobre los genes de nodulación en las tres estirpes estudiadas tras la introducción del plásmido pMP240 en cada una de ellas, **II)** comparar la producción total de AI en presencia/ausencia de diferentes flavonoides en las tres estirpes de rizobios y **III)** determinar el número de moléculas de tipo AI producidas por cada estirpe.

Para el primer tipo de ensayo de actividad β -galactosidasa, en el que se midió la capacidad de inducción de diferentes flavonoides sobre los genes de nodulación en las tres estirpes estudiadas, se empleó el método desarrollado por Miller (1972). Se inocularon, a partir de cultivos bacterianos crecidos en fase exponencial, tubos con 3 mL de YM líquido (suplementado con flavonoides cuando fue necesario) que se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica a 660 nm de 0,15-0,30. A continuación, 200 μL de estos cultivos se mezclaron con 800 μL de tampón Z, 20 μL de cloroformo y 10 μL de SDS al 0,1% (m/v). La mezcla se agitó vigorosamente durante 15 segundos para favorecer la lisis celular. A esta mezcla se le añadieron 200 μL de ONPG (orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) preparado a 4 mg mL^{-1} en tampón Z y se esperó a que la mezcla de reacción adquiriese un tono amarillo. En ese momento se detuvo la

reacción añadiendo 500 μL de Na_2CO_3 1M. Finalmente se midió la densidad óptica a 420 nm.

El segundo tipo de ensayos de actividad β -galactosidasa (**II**) se usó para medir la producción global de AI en las tres estirpes en estudio en presencia o ausencia de flavonoides inductores o no inductores de los genes de nodulación, para comprobar si estos flavonoides influyen en los sistemas de QS de los tres rizobios. Para ello se usó un método modificado del desarrollado por Miller (Pérez-Montaña *et al.* 2011) usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4). Los sobrenadantes de bacterias crecidas durante 6 días en agitación en medio YM(3), suplementados cuando se requirió con los flavonoides apropiados, fueron obtenidos por centrifugación y esterilizados por microfiltración. Se mezclaron diferentes volúmenes (1%, 5%, 10% y 20% v/v) de sobrenadantes con YM(3) hasta alcanzar un volumen final de 2,5 ml. Se estimó el porcentaje de volumen óptimo para no saturar al biosensor en cada una de las bacterias en estudio. Los 2,5 ml de YM(3) con la proporción adecuada de sobrenadante fueron inoculados con aproximadamente 10^7 bacterias/ml del biosensor, y se incubó 12 h en agitación. Transcurrido este tiempo, se procedió a la determinación de la actividad β -galactosidasa. El control negativo se preparó añadiendo 125 μl de agua destilada a 2,375 ml de YM(3). El control positivo se preparó a su vez añadiendo 125 μl de 3-oxo-C6-HL 5,5 μM a 2,375 ml de YM(3), tras lo cual, se inoculó al biosensor.

La actividad β -galactosidasa fue, además, usada para cuantificar y localizar los diferentes AI usando fracciones obtenidas por HPLC a partir de cultivos de los tres rizobios crecidos en presencia o ausencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación (**III**). Para ello, las fracciones de 1ml procedentes de la separación por HPLC fueron evaporadas mediante un flujo de aire hasta eliminar el etanol y acto seguido se reajustaron cada una de las fracciones hasta 1 ml con agua destilada. Los experimentos se llevaron a cabo en placas de poliestireno microtítulo de 96 pocillos con fondo en U (Greiner Bio-One). En cada uno de los pocillos se añadieron alícuotas de 100 μl de cada fracción y 100 μl de cultivo de *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) en fase exponencial ($\text{DO}_{660} = 0,4-0,6$). Como controles se usaron agua destilada estéril y agua destilada estéril mezclada con diferentes patrones de AHL. Después de 4 días de cultivo a 28 $^{\circ}\text{C}$, se midió la absorbancia en cada uno de los pocillos a 660 nm con un medidor de placas automático OASYS UVM 340 (Anthoc Labtec Instruments). Tras la medida,

se tomaron 40 µl de cultivo de cada uno de los pocillos y se llevaron a cabo ensayos de actividad β-galactosidasa según el protocolo de Miller adaptado al volumen de los pocillos (200µl) y usando tolueno en lugar de cloroformo.

La actividad β-galactosidasa en unidades Miller se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$U \text{ (Miller)} = 1000 \times D.O_{.420}/D.O_{.660} \times t \times V \text{ células (mL)}$$

t: tiempo transcurrido desde la adición de ONPG hasta que se detuvo la reacción.

Tampón Z

Na ₂ HPO ₄ H ₂ O	16,68 g
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	6,24 g
KCl	0,75 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,25 g
H ₂ O destilada	Completar hasta 1L

El pH del tampón se ajustó a 7,0.

3.2.3.- Visualización de exopolisacáridos (EPS)

Se puede estudiar “de visu” la producción de EPS cultivando las bacterias en cajas de medio YMA durante unas 120 horas a 28°C seguidas de 48 horas a temperatura ambiente.

3.2.4.- Estudio del lipopolisacárido (LPS)

3.2. 4.1.- Extracción del LPS

Se siguió el método descrito por Köplin *et al.* (1993). Se inocularon tubos con 3 mL de medio TY (suplementado con flavonoides cuando fue necesario) con las estirpes objeto de estudio y se crecieron en agitación a 28 °C durante 72 horas. Transcurrido este tiempo se tomaron 1,5 mL de estos cultivos y se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 5 minutos. Los sobrenadantes se retiraron con una pipeta y se desecharon. Los sedimentos que contenían las células se resuspendieron en 1 mL de NaCl al 0,9%, se centrifugaron de nuevo a 8000 r.p.m. durante 5 minutos y se lavaron tres veces con NaCl 0,9%. En el último lavado se eliminaron cuidadosamente los restos de NaCl y las células se lisaron

añadiendo 125 μL de tampón I, agitándolas vigorosamente e hirviéndolas durante 6 minutos. Transcurrido este tiempo, las muestras se dejaron enfriar y a continuación se les añadieron 875 μL de tampón II y se trataron con 3 μL de ARNasa (10 mg mL^{-1}) y 10 μL de ADNasa (1 mg mL^{-1}), incubándolas durante 4 horas a 37°C . Pasado este tiempo, se trataron con 10 μL de proteinasa K ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) dos veces, incubándolas a 37°C durante 24 horas en cada tratamiento. A las muestras, con las células ya lisadas, se le añadió tampón de resuspensión en proporción 1:1 (v/v), se mezcló bien y se hirvieron durante 6 minutos. Posteriormente, se centrifugaron a 13000 r.p.m. durante 7 minutos y se tomaron 600 μL del sobrenadante. Las muestras así preparadas se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Soluciones empleadas:

Tampón I (LPS)	Tris-HCl 60mM, SDS 2% (m/v), EDTA 1mM; pH 6,8.
Tampón II (LPS)	Tris-HCl 60mM, EDTA 1mM; pH 6,8.
Tampón de resuspensión (LPS)	5,9 mL de tampón I, 4mL de glicerol, 0,8 mL de β -mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,05% (m/v).

3.2. 4.2.- Electroforesis del LPS

La electroforesis de los LPS se realizó en gel de poliacrilamida al 15% en un tanque Mini Protean II (Bio-Rad) a 150 V durante 45-60 minutos.

3.2. 4.3.- Tinción del LPS

Los geles se sumergieron en solución de fijación durante al menos 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se cambió la solución de fijación por otra de oxidación y se mantuvieron en agitación suave durante 10 minutos. Posteriormente se lavaron vigorosamente 5 veces con agua destilada (5 minutos cada lavado) y se tiñeron con AgNO_3 al 0,1% (m/v) durante 30 minutos en total oscuridad. Tras dos lavados breves con agua destilada, los geles se revelaron con Na_2CO_3 al 3% (m/v) y 35 $\mu\text{L}/100 \text{ mL}$ de formaldehído al 35%. La reacción se detuvo lavando los geles con abundante agua destilada cuando se distinguieron con claridad las bandas correspondientes a los LPS.

Soluciones empleadas:

Solución de fijación*	Etanol 50% (v/v), ácido acético glacial 12,5% (v/v).
Solución de oxidación*	Solución de fijación con NaIO_4 0,7% (m/v).

*Las soluciones se completaron con agua.

3.2.5.- Estudio de las proteínas extracelulares

3.2.5.1.- Extracción de las proteínas extracelulares

Se siguió el método descrito por Krishnan y Pueppke (1993) con ciertas modificaciones. Se inocularon matraces de 250 mL que contenían 50 mL de medio YM líquido (suplementado con el flavonoide adecuado cuando fue necesario) con 500 μ L de cultivo de las estirpes a ensayar y se incubaron en agitación a 28 °C durante 40 horas. Transcurrido este tiempo, los cultivos se centrifugaron a 10000 g durante 20 minutos a 4 °C y se retiraron las células. Al sobrenadante obtenido se le añadieron 3 volúmenes de acetona fría y, con la ayuda de una varilla, se retiró el polisacárido precipitado. La mezcla se mantuvo a -20 °C durante al menos 24 horas para que las proteínas precipitaran. Posteriormente se centrifugó a 17000 g durante 45 minutos a 4 °C y el sedimento obtenido se dejó secar completamente. Finalmente, este sedimento se resuspendió en tampón de muestra.

Soluciones empleadas:

Tampón de muestra	Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, SDS 2% (m/v), glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 5% (v/v), azul de bromofenol 0,05% (m/v).
-------------------	---

3.2.5.2.- Electroforesis de las proteínas

La electroforesis unidireccional se realizó en condiciones desnaturalizantes, que separa las proteínas según su masa molecular, siguiendo el método descrito por Laemmli (1970).

Las proteínas resuspendidas en tampón de muestra, se calentaron a 100 °C durante 5 minutos y se mantuvieron en hielo. Posteriormente se centrifugaron y el sobrenadante obtenido se cargó en el gel junto con el marcador de masa molecular de amplio rango suministrado por Bio-Rad.

Se prepararon geles de distinta concentración de acrilamida dependiendo del tamaño de las proteínas que se querían separar. Así, se utilizaron geles del 10-12% de acrilamida para separar proteínas de mayor tamaño y geles del 15-20% para separar proteínas más pequeñas. Posteriormente, los geles inmersos en tampón de electroforesis se desarrollaron a 150 V en cubetas Mini Protean II y Protean II (Bio-Rad), hasta que el colorante alcanzó el borde inferior del gel.

Gel de separación:

	7,5%	12%	15%	18%	20%
Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	5,64 mL	9 mL	11,25 mL	13,5 mL	15 mL
H ₂ O	16,41 mL	13,05 mL	10,8 mL	8,55 mL	7,05 mL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL	7,5 mL
SDS 10% (m/v)	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL	300 µL
APS 10% (m/v)	125 µL	125 µL	125 µL	125 µL	125 µL
TEMED	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL	15 µL

Gel de empaquetamiento:

	4%
Acrilamida/bisacrilamida 40% 29:1	750 µL
H ₂ O	4,7 mL
Tris-HCl 0,5M pH 6,8	1,89 mL
SDS 10% (m/v)	75 µL
APS 10% (m/v)	37,5 µL
TEMED	7,5 µL

NOTA: los volúmenes indicados son los adecuados para geles de 17 x 17 cm.

Soluciones empleadas:

Tampón de electroforesis 5X Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% (m/v) pH 8,3.

3.2.5.3.- Tinción de las proteínas con plata

La tinción de proteínas con plata es un método más sensible que el azul de Coomassie. Una vez terminada la electroforesis, el gel se sumergió en fijador durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se añadió el oxidante y se mantuvo otros 30 minutos en agitación. Posteriormente, se lavó tres veces durante 5 minutos con agua destilada, se añadió el reactivo de plata y se incubó durante 20 minutos en total oscuridad para evitar la tinción de fondo. Una vez teñido, el gel se lavó brevemente dos veces con agua destilada y se añadió el revelador. La reacción se detuvo lavando brevemente con agua destilada y añadiendo finalmente una solución de EDTA-Na₂H₂O (3,65 g en 250 mL de agua Milli-Q).

Soluciones empleadas:

Fijador	Etanol 40% (v/v), ácido acético glacial 10% (v/v).
Oxidante	Etanol 30% (v/v), acetato de sodio 0,8M, tiosulfato de sodio (5% [m/v]) 0,04% (v/v).
Reactivo de plata	Nitrato de plata 2,5% (m/v) en agua Milli-Q.
Revelador	Na ₂ CO ₃ 0,22M, formaldehído 0,0002% (v/v).

3.2.6.- Estudios de movilidad bacteriana

Los estudios de movilidad bacteriana tipo swimming se llevaron a cabo en placas de Petri cuadradas de 10 x 10 cm, usando como medio de cultivo YM(3) con 0,3 % de agar suplementado, en caso de ser necesario, con el flavonoide adecuado. Las bacterias se crecieron en 5 ml de medio YM(3) líquido durante 48 horas hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ \approx 1,0. De estos preinóculos se tomaron 3 μ l y se inyectaron en el agar. Las placas se incubaron a 28 °C. Cada 24 horas se midió el diámetro del halo generado por la movilidad bacteriana.

3.2.7.- Estudios de formación de biofilm bacterianos

Los estudios de adhesión a superficies abióticas producidos por las diferentes estirpes bacterianas se llevaron a cabo en placas microtítulo con fondo en U de poliestireno (Deltalab S.L.). Para ello, se inocularon las estirpes en 5ml de medio MGM bajo en fosfato durante 48 horas a 28 °C. Transcurrido este tiempo, se midió la D.O.₆₀₀ y se diluyeron los cultivos hasta una D.O.₆₀₀ de 0,2, suplementándolos en caso de ser necesario, con el flavonoide adecuado. A partir de estas diluciones, se añadieron 100 μ l a cada pocillo de la placa microtítulo, se tapó con tapas de poliestireno (Deltalab S.L.) y con cuidado, se invirtió la placa y se introdujo en una cámara húmeda. Todo el sistema se incubó a 28 °C durante 6 días en agitación suave (120 rpm). Transcurrido este tiempo, se midió la D.O.₆₀₀ en el lector de placas Synergy HT (BioTek) y se retiraron cuidadosamente los cultivos bacterianos. Posteriormente, se dejó secar la placa a 37 °C durante al menos 3 horas. Transcurrido este tiempo, se dieron tres lavados en NaCl 0,9% por inmersión de la placa microtítulo, y se volvió a dejar secar a 37 °C durante al menos 3 horas. Tras el lavado y secado, se añadieron 100 μ l de cristal violeta 0,1 % por pocillo y se dejó tiñendo durante 20 minutos, tras los cuales, se sumergió 3 veces la placa en agua destilada. Tras un nuevo periodo de 3 horas secándose a 37 °C, se añadieron a cada pocillo de la placa 100 μ l de etanol 96 %, y se dejó en agitación suave hasta que todo el cristal violeta estuviese disuelto. Por último se midió la D.O. a 570 nm.

3.2.8.- Curvas de crecimiento.

Se midió el crecimiento de las tres estirpes bacterianas (SMH12, ISP42 e IS123) en presencia/ausencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación y, también se midió el crecimiento de la estirpe silvestre *S. fredii* SMH12 y sus derivados. En cada experimento la metodología empleada fue diferente.

El crecimiento de las estirpes bacterianas se analizó cultivándolas en medio YM(3). Para ello se prepararon precultivos de los microorganismos en 5 ml de medio YM(3) y, cuando alcanzaron una absorbancia a 600 nm en torno a 1 se diluyeron 100 veces en tubos con 5 ml de medio YM(3) suplementado o no con el flavonoide adecuado (genisteína en el caso de SMH12, apigenina en el de ISP42 o daidzeína en el de IS123) en el caso de las curvas de crecimiento en presencia/ausencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación. Se inocularon tres tubos de 5 ml por cada condición de estudio y se midió la absorbancia a 600 nm cada dos o cuatro horas hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento. El experimento fue llevado a cabo por duplicado.

En el caso de las curvas de crecimiento de los derivados de *S. fredii* SMH12, el procedimiento fue diferente, ya que las bacterias se cultivaron en placas multipocillo. Así pues, se prepararon precultivos de los microorganismos en 5 ml de medio YM(3) y, cuando alcanzaron una absorbancia a 600 nm en torno a 1 se diluyeron 100 veces en placas multipocillo con 200 µl de medio YM(3) en cada pocillo. De esta forma se inocularon 6 pocillos por cada bacteria y se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de placas Synergy HT (BioTek) cada dos o cuatro horas hasta que los cultivos alcanzaron la fase estacionaria. El experimento fue llevado a cabo por duplicado.

3.3.- Métodos de biología molecular

3.3.1.- Extracción del ADN genómico

Para la purificación de ADN genómico de *Sinorhizobium* y *Rhizobium* se utilizó el kit Quantum prep Aquapure Genomic DNA isolation kit (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.3.2.- Extracción del ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo mediante dos métodos, el primero de ellos siguiendo el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989) y el segundo de ellos mediante el kits NucleoSpin Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para el protocolo descrito por Sambrook se centrifugaron 1,5 mL de un cultivo en fase estacionaria a 13000 x g durante 1 minuto para recoger las células. Tras la centrifugación, se desechó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 100 µL de solución I utilizando un vórtex. A continuación, se añadieron 200 µL de solución II y se mezcló invirtiendo el tubo varias veces hasta que la mezcla se clarificó. Posteriormente, se añadieron 150 µL de solución III y se mezcló, para después centrifugar a 13000 x g. durante 10 minutos. El sobrenadante se pasó a un tubo vacío y se añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Se mezcló mediante vórtex y se centrifugó a 13000 x g durante 5 minutos. La fase superior acuosa se retiró cuidadosamente a otro tubo con un pipeta y se le añadió 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se volvió a mezclar y se centrifugó a 13000 x g durante 5 minutos. La fase superior se pasó cuidadosamente a otro tubo y se le añadieron 2,5 volúmenes de etanol absoluto. La mezcla se mantuvo a -20 °C durante al menos 20 minutos para que el ADN precipitara y se centrifugó a 13000 x g. durante 20 minutos. El precipitado se lavó con etanol al 70%, se dejó secar y se resuspendió en 20 µL de tampón TER.

Soluciones empleadas:

Solución I	Glucosa 50mM, Tris-HCl 25 mM, pH 8, EDTA 10 mM, pH 8.
Solución II*	NaOH 0,2M, SDS 1% (m/v).
Solución III	Acetato potásico 5M [60% (v/v)], ácido acético glacial 11,5% (v/v).
Tampón TER	Tris-HCl 10 mM, pH 8; EDTA 1 mM, pH 8; ARNasa 50 µg mL ⁻¹ .

* Preparar en el acto

La extracción de plásmidos también se realizó utilizando los kits NucleoSpin Plasmid Quick Pure (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.3.3.- Restricción del ADN

Se utilizaron las endonucleasas de restricción suministradas por Roche y NewEngland Biolabs. En todos los casos se utilizaron los tampones y se siguieron las instrucciones del fabricante. La eficiencia de la restricción se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.3.4.- Electroforesis del ADN

Se llevó a cabo en geles de agarosa desde el 0,6% hasta el 2% (m/v) preteñidos con bromuro de etidio (5 µl de bromuro de etidio 0,325 mg/ml por cada 50 ml de gel de agarosa) en tampón TAE 0,5X dependiendo del peso molecular de los fragmentos que se quisieron identificar (Maniatis *et al.*, 1982). Las muestras de ADN mezcladas con el tampón de carga se añadieron a los pocillos del gel. Como patrones de referencia se usaron diferentes marcadores de peso molecular, como el ADN del fago λ digerido con la enzima de restricción *HindIII*. La electroforesis se llevó a cabo utilizando el aparato Mupid-21 (Cosmo Bio) a 50 ó 100 V. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV a 260 nm. A continuación se capturaron las imágenes utilizando el sistema de captación de imágenes Gel Doc 2000 (Bio-Rad) y analizándolas con el programa informático Quantity One (Bio-Rad).

Soluciones empleadas:

Tampón TAE	Tris-HCl 30mM, 0,002% (v/v) EDTA 0,5M pH 8, ácido acético glacial 0,00114% (v/v). Ajustar el pH a 8.
Tampón de carga	Azul de bromofenol 0,25% (m/v), xileno cianol FF 0,25% (m/v), glicerol 30% (v/v).

3.3.5.- Aislamiento del ADN de geles de agarosa

Para recuperar el ADN de un gel de agarosa, se cortó la porción de éste que contenía la banda de interés. El ADN se purificó mediante el kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.3.6.- Desfosforilación del ADN

Tras la restricción de un vector, se añadió a la mezcla de reacción la enzima fosfatasa alcalina (Roche) y se incubó la reacción durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se inactivó la enzima añadiendo ácido etilén-glicol tetraacético (EGTA) 0,2M pH 9,0 a la mezcla de reacción en una proporción 1:10 (v/v) e incubando durante 30 minutos a 65 °C. Finalmente la mezcla se fenolizó y el ADN se precipitó con etanol absoluto o se purificó mediante el kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.3.7.- Conversión de extremos cohesivos en romos

Se realizó cuando las enzimas de restricción empleadas no eran compatibles para ligar vector e inserto.

Si la endonucleasa origina extremos 5' monocatenarios, éstos se pueden convertir en bicatenarios mediante la actividad polimerasa del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* en presencia de desoxinucleótidos trifosfatos (dNTP). Para ello, tras la digestión del ADN con la enzima adecuada en un volumen final de 20 µL, se añadió 1 µL de una solución de dNTP a una concentración de 1 mM y 1 unidad de la enzima Klenow. La reacción se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se inactivaron las enzimas presentes en la reacción calentando a 75 °C durante 10 minutos o mediante fenolización.

Si la enzima de restricción produce extremos 3' monocatenarios, se pueden usar dos enzimas, el propio fragmento Klenow, con el mismo procedimiento que el anterior (pero sin añadir dNTP), ya que tiene actividad exonucleasa, o se realiza un tratamiento similar pero utilizando la ADN polimerasa del bacteriófago T4 que tiene actividad exonucleasa. Para ello, tras la digestión del ADN con la enzima adecuada en un volumen final de 20 µL, se añadió 1 µL de una solución de dNTP a una concentración de 2 mM y 1-2 unidades de polimerasa T4. La reacción se incubó durante 15 minutos a 12 °C. Posteriormente, se inactivaron las enzimas presentes en la reacción calentando a 75 °C durante 10 minutos o mediante fenolización.

3.3.8.- Ligación del ADN

Para clonar un fragmento de ADN en un vector, las moléculas de ADN ya digeridas con la(s) enzima(s) de restricción adecuada(s), tratadas con fenol y precipitadas con etanol absoluto, se mezclaron en las proporciones adecuadas y se les añadió 1/10 del volumen final del tampón de ligación y 1 μL ($1 \text{ U } \mu\text{L}^{-1}$) de la ligasa de T4 (Roche). La mezcla se incubó durante un mínimo de 4 horas a temperatura ambiente (para extremos cohesivos) o a 4 °C (para extremos romos). Los productos de la reacción se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* mediante el método descrito anteriormente.

3.3.9.- Amplificación del ADN por PCR

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Saiki (1990). Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

- 1.- Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 minutos.
- 2.- Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 30 segundos.
- 3.- Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (Tib Molbiol e IDT) durante 30 segundos.
- 4.- Polimerización del ADN a 72 °C variando el tiempo de polimerización en función del tamaño del ADN a amplificar (1 minuto/kb).
- 5.- Repetición del ciclo de polimerización (desde el paso 2), de 34 a 39 veces más.
- 6.- Polimerización del ADN a 72 °C durante 5 minutos.

El volumen de la mezcla de reacción varió dependiendo del experimento. Como norma general, 20 μL de mezcla reacción contenían los cebadores usados a una concentración de 0,2 μM , dNTP a 0,2 mM, tampón de PCR y 0,1 U de *Taq* polimerasa.

Los cebadores (Tabla 3.2.) fueron diseñados utilizando el programa informático GeneFisher 1.22 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>). Los cebadores utilizados se diseñaron teniendo en cuenta que:

- 1.- La longitud fuera de alrededor de 20 nucleótidos.
- 2.- El porcentaje de G + C estuviera comprendido entre 55-65%.
- 3.- La temperatura de fusión (T_m) estuviera comprendida entre 50-65 °C.
- 4.- Los cebadores no aparearan entre sí.

Tabla 3.2. Cebadores utilizados en experimentos de amplificación del ADN por PCR.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	T _m (°C)
TraI F	CCAGAAGATTGGGATTGACA	20	53,5
TraI R	TGTCCGCCTATCGGAAGCTCA	21	62,6
Railext F	CCCCGGGATATCGCCTCTCGA	21	66,4
Railext R	GCAACCATGGCGCGATGTGA	20	65,9
Cinlex F	GCTAATCCCCCATCTGA	18	53,5
Cinlex R	GCTGAGCCTTCTTTTCGTA	19	52,4
Sinlex F	GCAGGAAAAGACGAGTGTC	20	55,2
Sinlex R	CCGAGGGTTCTTGAGATCGA	20	57,7
MelI F	GCAGATGATCGTGCTGA	17	49,7
MelI R	CCAGGGAAACGGAGGA	16	54
TraI(2) F	GATTCCCTCCTGCTGACA	18	52,6
TraI(2) R	GACGGTTTCTGACACGA	18	51,7
RaIint F	CCTCACCAAAGACATGCTCGAGA	22	58,1
RaIint R	CATGCCGCTATCGGCGAGA	19	62,8
CinIint F	GCTGCCATCTCCAGGAA	17	53,9
CinIint R	CCTATCTCGTCTGGTGCA	18	51,5
SinIint F	GATCAGGATAGTGAACGGAA	20	50,2
SinIint R	GAAGCAGACTTCTCGACA	18	48,1

3.3.10.- Cuantificación de la expresión de genes mediante qPCR

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Pérez-Montaña *et al.* (2011). Los programas usados en cada caso siguen el siguiente esquema común:

- 1.- Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 5 minutos.
- 2.- Desnaturalización del ADN a 95 °C durante 30 segundos.
- 3.- Unión de los cebadores al ADN de cadena simple a la temperatura recomendada por el fabricante (Tib Molbiol e IDT) durante 30 segundos.
- 4.- Polimerización del ADN a 72 °C durante 15 segundos.
- 5.- Lectura de la fluorescencia.
- 6.- Repetición del ciclo de polimerización (desde el paso 2), 39 veces más.
- 7.- Polimerización del ADN a 72 °C durante 5 minutos.
- 8.- Melting Curve desde 60 °C a 90 °C.

El volumen de la mezcla de reacción fue de 20 µL. Las mezclas de reacción contenían los cebadores usados a una concentración de 0,3 µM y 10 µl de FastStar SYBR Green Master (Roche).

Los cebadores (Tabla 3.3.) fueron diseñados utilizando el programa informático GeneFisher 1.22 (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/genefisher/>). Los cebadores utilizados se diseñaron teniendo en cuenta que:

- 1.- La longitud del oligonucleótido era de aproximadamente 20 nucleótidos.
- 2.- El porcentaje de G + C estuviera comprendido entre 50-60%.
- 3.- La temperatura de fusión (T_m) estuviera comprendida entre 50-65 °C.
- 4.- Los cebadores no aparearan entre sí.
- 5.- El tamaño del amplicón debía estar comprendido entre 150-180 nucleótidos.

Tabla 3.3. Cebadores utilizados en experimentos de cuantificación de la expresión de genes mediante qPCR.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	pb	Tm (°C)
TraI-RT F	CCCACCTACATCCTAGCCGTA	21	57,7
TraI-RT R	CAAGGAAGGTGTCCACGCAA	20	60,9
RaiI-RT F	CCGATACGACGAGGCTGA	18	56,4
RaiI-RT R	GCATGCGGATGAAGGCAA	18	59,3
CinI-RT F	GTCTGGTGCAACGACA	16	49,5
CinI-RT R	GCATCGATGTTGGGGAA	17	53,7
NodA-RT F	CGTCATGTATCCGGTGCTGCA	21	62,8
NodA-RT R	CGTTGGCGGCAGGTTGAGA	19	64,2
16S-RT F	TAAACCACATGCTCCACC	18	52,3
16S-RT R	GATACCCTGGTAGTCCAC	18	51,2

3.3.11.- Hibridación ADN/ADN

Se empleó un sistema no radiactivo que se basa en el marcaje al azar de ADN con digoxigenina-dUTP y la detección de los híbridos ADN/ADN-digoxigenina mediante enzimoimmunoensayo. Para esta detección se utilizó un anticuerpo conjugado (antidigoxigenina conjugado con la enzima fosfatasa alcalina). El resultado de la hibridación se obtuvo por reacción colorimétrica en el mismo filtro de hibridación.

3.3.11.1.- Transferencia del ADN a filtros de nylon

Una vez realizada la electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos de ADN, junto con el marcador de peso molecular marcado con digoxigenina (Roche), se transfirieron a filtros de nylon (Southern, 1975) Hybond-N (Amersham Biosciences). Para ello, el gel inmediatamente después de la electroforesis, se sumergió en HCl 0,25M durante 20

minutos con agitación suave. Posteriormente, se lavó con agua destilada y se mantuvo en una solución de desnaturalización durante 30 minutos en agitación. La transferencia del ADN a los filtros se realizó por capilaridad del tampón de transferencia alcalino a través de papel whatman durante 4-15 horas en presencia del tampón de transferencia alcalino. Transcurrido ese tiempo, se marcaron los pocillos en la membrana con un lápiz y los filtros se lavaron en SSC 2X durante 5 minutos. Finalmente, el ADN se fijó al filtro por exposición a la luz ultravioleta durante 2 minutos.

Soluciones empleadas:

SSC 20X	NaCl 2,1M, citrato de sodio 0,3M. Ajustar el pH a 7.
Solución de desnaturalización	NaCl 1,5M, NaOH 0,5M.
Tampón de transferencia alcalino	NaCl 1,5M, NaOH 0,25M.

3.3.11.2.- Marcaje de la sonda

El marcaje de la sonda se realizó mediante el uso de la técnica de la PCR: Se realizó una PCR en la que se añadió a la mezcla normal de PCR, 1 μ L de dNTP 10X que contiene UTP marcado con digoxigenina.

3.3.11.3.- Hibridación de la sonda al ADN del filtro

El filtro nylon se introdujo en una bolsa y se le añadió la solución de prehibridación (entre 1 y 10 mL, dependiendo del tamaño del filtro), que contenía esperma de salmón (100 μ g mL⁻¹) previamente desnaturalizado por calor (95 °C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo). El filtro se prehibridó con esta solución incubándolo de 2 a 6 horas a 28, 32 ó 37 °C en condiciones de heterología o a 42 °C en condiciones de homología. Transcurrido este tiempo, se retiró la solución de prehibridación y se añadió la sonda, previamente desnaturalizada por calor (95 °C durante 10 minutos y 5 minutos en hielo) y diluída en 2,5 mL de solución de prehibridación. El filtro se incubó con esta nueva solución durante toda la noche a la misma temperatura que se usó en la prehibridación.

Soluciones empleadas:

SSC 20X	NaCl 2,1M, citrato de sodio 0,3M. Ajustar el pH a 7.
SDS 20% ^a	SDS 200 g L ⁻¹ .
Solución de prehibridación ^b	100 mL SSC 20X (v/v), 0,4 mL SDS 20% (m/v), 100 mL agua Milli-Q, 20 g de reactivo de bloqueo (Roche), 0,4 g N-laurilsarcosina.

^a Calentar 800 ml de agua destilada, añadir y disolver el SDS, ajustar el pH a 7,2 y enrasar a 1 L con agua destilada.

^b Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor y añadir el mismo volumen de formamida desionizada. Se almacena a -20 °C.

Transcurrido este tiempo se procedió a lavar el filtro. Los lavados son distintos dependiendo de las condiciones de estringencia elegida:

1. Heterología: El filtro se lavó dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente y después se lavó otras dos veces con la misma solución a 42 °C durante 15 minutos.

2. Homología: El filtro se lavó dos veces con una solución de SSC 2X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente, después se lavó otras dos veces con SSC 1X, SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente y, por último, dos lavados más con SSC 0,1X, SDS 0,1% durante 15 minutos a 68 °C.

3.3.11.4.- Detección inmunológica

Después de realizar los lavados, el filtro se incubó durante 5 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente y con agitación para eliminar los restos de SDS. Posteriormente, los filtros se introdujeron en bolsas de hibridación junto con 10 mL de tampón 2 y se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. A continuación, se retiró el tampón 2 y se cambió por una nueva solución de tampón 2 que contenía el anticuerpo antidigoxigenina en una proporción de 1:5000 (v/v). El filtro se incubó en esta solución durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Para eliminar el anticuerpo no fijado, el filtro se extrajo de la bolsa y se lavó dos veces durante 15 minutos en 100 mL de tampón 1 a temperatura ambiente con agitación. Finalmente, el filtro se equilibró en 50 mL de tampón 3 durante 5 minutos.

Soluciones empleadas:

Tampón 1	Tris-HCl 100mM pH 8 y NaCl 150mM.
Tampón 2*	Reactivo de bloqueo al 2% (m/v) disuelto en tampón 1.
Tampón 3	Tris-HCl 80mM pH 9,5, NaCl 100mM y MgCl ₂ 50mM.
Solución de revelado	66 µL de solución NBT (75 mg mL ⁻¹ de nitroazul tetrazolio en dimetilformamida al 70%), 66 µl de solución de BCIP (50 mg mL ⁻¹ de 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en dimetilformamida al 100%) en 10 mL de tampón 3.

* Disolver el reactivo de bloqueo con agitación magnética y calor. Almacenar a 4 °C.

Para visualizar el resultado se usó un método colorimétrico que consiste en introducir los filtros en bolsas de hibridación herméticamente selladas junto con una solución de revelado. Las bolsas se incubaron a temperatura ambiente y en oscuridad hasta que el resultado de la hibridación fuera claramente visible. Posteriormente los filtros fueron lavados con agua destilada y se secaron al aire.

3.3.12.- Secuenciación del ADN

La secuenciación del ADN se llevó a cabo en los servicios de secuenciación de NewBioTechnics (NBT).

3.3.13.- Análisis informático de secuencias de ADN y proteínas

Para el análisis informático básico de las secuencias de ADN y proteínas se empleó el programa de comparación de secuencias BLAST disponible en la página web del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi).

3.3.14.- Análisis por qPCR

Se incubaron los cultivos de las estirpes a estudiar en medio YM (suplementado con flavonoides cuando fue necesario) a 28°C hasta que alcanzaron una densidad óptica a

600 nm de 0,5. La extracción del ARN bacteriano se realizó utilizando el kit RNAeasy kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, el ARN obtenido se retrotranscribió utilizando el kit Quantitect (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se utilizó como molde para llevar a cabo reacciones de qPCR utilizando los cebadores específicos adecuados. Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en el termociclador MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad), y los análisis de expresión de genes se llevaron a cabo usando el Software MiniOpticon v.3.1.

3.4.- Métodos utilizados para los estudios con las plantas

3.4.1.- Plantas

Las plantas empleadas en esta Tesis están recogidas en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Plantas utilizadas en esta Tesis.

Especie	Variedad/cultivar
<i>Glycine max</i> L. Merrill	Osumi
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	BBL
<i>Oryza sativa</i> L.	Puntal

3.4.2.- Soluciones nutritivas para las plantas

Para el crecimiento de las plantas se utilizó la solución de Fåhræus carente de nitrógeno combinado en el caso de los ensayos de nodulación. En los ensayos de nodulación para la observación con microscopía electrónico de barrido y con microscopía confocal se usó la solución Rigaud & Puppo sin nitrógeno combinado. En la obtención de muestras para los ensayos de intercepción en el QS bacteriano se usó la solución Rigaud & Puppo con nitrógeno combinado.

Solución de Fåhraeus (Vincent, 1970)

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,12 g
KH ₂ PO ₄	0,1 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O/Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0,15 g/0,075 g
Citrato férrico*	1 mL
Solución de Gibson**	1 mL
H ₂ O	Completar hasta 1 L

Añadir primero la solución de Gibson y el citrato férrico y después añadir uno a uno el resto de componentes esperando siempre a que se disuelva antes de añadir el siguiente.

El pH del medio se ajustó a 6,5 -7,0 y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

Solución Rigaud-Puppo (Rigaud & Puppo, 1975)

(Con nitrógeno) KNO ₃ / (Sin nitrógeno)	0,5 g/-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 g
K ₂ SO ₄	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Cl ₂ Ca·2H ₂ O	0,1 g
Quelante de hierro (Sandofer)	0,02 g
Solución de Gibson**	1 mL
H ₂ O	Completar hasta 1 L

Añadir primero la solución de Gibson y después añadir uno a uno el resto de componentes esperando siempre a que se disuelva antes de añadir el siguiente.

El pH del medio se ajustó a 6,5 -7,0 y posteriormente se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121°C).

****Solución de micronutrientes de Gibson**

H ₃ BO ₃	2,86 g
MnSO ₄ ·H ₂ O	2,08 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,22 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,08 g
Na ₂ MoO ₄	0,13 g
H ₂ O	Completar hasta 1 L

***Citrato férrico:** Se preparó disolviendo con calor 5g L⁻¹ de citrato férrico en H₂O destilada.

3.4.3.- Desinfección y germinación de semillas

Las semillas de *G. max* se desinfectaron mediante un tratamiento con etanol de 96° durante 30 segundos, seguido de otro con lejía comercial (hipoclorito sódico al 6%) durante 6 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron seis veces con abundante agua destilada estéril hasta que el agua de lavado alcanzó un pH de 7. En el caso de *P. vulgaris*, las semillas se desinfectaron mediante un tratamiento con etanol de 96°

durante 1 minuto, seguido de otro con lejía comercial durante 12 minutos. Tras ello, las semillas se lavaron seis veces con abundante agua destilada estéril hasta que el agua de lavado alcanzó un pH de 7. Por último, la desinfección de semillas de *O. sativa* se inició con el descascarillado previo de las semillas, seguido de un tratamiento con etanol de 96° durante 1 minuto, y de otro con lejía comercial durante 20 minutos. A continuación se lavaron varias veces con agua destilada estéril hasta que el pH del lavado alcance pH 7. Las semillas desinfectadas se colocaron en placas de Petri que contenían agar-agua [1% (m/v)] y se incubaron en oscuridad y a temperatura ambiente o a 28 °C hasta su germinación.

3.4.4.- Inoculación y cultivo de plantas

Para los ensayos de nodulación las semillas germinadas se transfirieron a un sistema estéril denominado jarro de Leonard (Vincent, 1970). El sistema consiste en un depósito de ~1,5 L que contiene solución de Fähraeus. Sobre este depósito se colocó un recipiente a modo de maceta que contiene 800 cm³ de vermiculita mezclada con perlita [vermiculita:perlita (4:1) lavada con agua] y humedecidas con 250 mL de la misma solución nutritiva. La maceta y el depósito se conectaron mediante una mecha de algodón de aproximadamente 20 cm de longitud. El jarro completo se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). En cada jarro se colocaron dos semillas de soja o judía. Cada semilla se inoculó con 1 mL de cultivo bacteriano en fase exponencial que presentaban una densidad óptica a 600 nm de alrededor de 0,5.

Para los ensayos de colonización previos a la observación al microscopio electrónico de barrido y al microscopio óptico de epifluorescencia, así como para la obtención de muestras para los ensayos en la intercepción del QS bacteriano, las semillas germinadas se transfirieron a un sistema estéril hidropónico. En un tubo de cristal de 3 cm de diámetro se colocó una rejilla de acero doblada en forma de silla de tal manera que la solución nutritiva quedó a nivel de la zona horizontal de la rejilla (15 ml de Fähraeus en el caso de los experimentos de colonización de la raíz y 15 ml de Rigaud & Puppo con nitrógeno en el caso de los ensayos de intercepción del QS bacteriano). Se tapó el tubo de cristal con algodón y papel de plata y se esterilizó en el autoclave durante 20 minutos a una atmósfera de sobrepresión (121 °C). En cada tubo se colocaron dos semillas de

arroz o dos semillas de judía. Cada semilla se inoculó, en caso de los ensayos de colonización, con 1 mL de cultivo bacteriano en fase exponencial que presentaban una densidad óptica a 600 nm de alrededor de 0,5.

3.4.5.- Ensayos de nodulación y colonización

Los ensayos de nodulación se realizaron para analizar las propiedades simbióticas de las distintas estirpes estudiadas en esta Tesis. Los ensayos de colonización se realizaron para analizar la capacidad de adhesión a las raíces de diferentes estirpes bacterianas. Ambos ensayos se llevaron a cabo en cámara de plantas con un fotoperíodo de 16 horas de luz (con intensidad de $400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas de oscuridad a aproximadamente 26 °C y 18 °C, respectivamente. En los ensayos de nodulación las plantas de soja y judía se mantuvieron en la cámara de plantas durante 7 semanas. En los ensayos de colonización, las plantas de soja se mantuvieron en la cámara durante 7 días.

Los análisis estadísticos de los resultados se realizaron con el programa Statistix for Windows Analytical software, usando el test adecuado.

3.4.5.1.- Secado de la parte aérea de la planta

La parte aérea de las plantas se secó en una estufa para desecación (J.P. Selecta) a 80 °C durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo se dejó otras 24 horas con el horno apagado y totalmente cerrado. Finalmente las plantas se pesaron.

3.5.- Técnicas para el estudio de los sistemas de QS bacteriano

3.5.1.- Obtención de AI de los sobrenadantes de cultivos bacterianos

Para la obtención de AI de sobrenadantes de cultivos bacterianos las bacterias en estudio se crecieron en 5 ml de YM(3) o en TY, a 28 °C, en agitación durante el tiempo adecuado y, tras ello, se centrifugaron los cultivos y se tomaron los sobrenadantes para posteriores ensayos.

3.5.2.- Ensayos de detección de AI

Para la detección de AI producidos por las tres estirpes bacterianas se llevaron a cabo ensayos de difusión en placa de Petri usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) tal y como se describe por Cha *et al.* (1998). El método consistió en colocar cilindros metálicos de 0,8 cm de diámetro por 1 cm de altura previamente esterilizados en placas de Petri sobre las que se dejó solidificar medio YM con agar. Acto seguido se añadió a cada placa 4 ml de agar de cobertera con 400 µl de cultivo crecido hasta fase estacionaria del biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y 40 µl de X-Gal (20 mg/mL). Después de solidificarse se retiraron los cilindros metálicos y en cada pocillo se añadieron aproximadamente 200 µl de los sobrenadantes bacterianos obtenidos previamente. Las placas se incubaron 48 horas a 28 °C.

3.5.3.- Extracción y separación de AI mediante cromatografía en capa fina (TLC)

La cromatografía en capa fina (TLC, Thin Layer Chromatography) se empleó para separar los diferentes compuestos que podían contener los extractos con actividad autoinductora. Para ello, se obtuvieron sobrenadantes de las bacterias crecidas durante 6 días en 15 ml de medio YM(3) y se extrajeron con un volumen de diclorometano. Tras esto se evaporaron los extractos de diclorometano hasta sequedad y se resuspendieron en 150 µl de acetato de etilo acidificado (0,1 % de ácido acético glacial). Para cada bacteria se cargó un volumen adecuado del concentrado en la TLC (HPTLC plates RP-18 F₂₅₄S 1.13724 y 1.05559, Merck) y se usó metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Por último, se dejó secar la cromatoplaca para evaporar todo el solvente.

3.5.4.- Detección de AI en cromatoplacas

Tras la separación de los AI mediante TLC, su detección se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Cha *et al.* (1998). Se usaron, según el número de muestras cargadas, placas TLC de 10x10 cm o de 20x20 cm. El biosensor usado para revelar las placas fue *A. tumefaciens* NT1(pZRL4). El protocolo usado fue el que se describe a continuación: se mezclaron 20/80 ml de YM(3) 1,2% de agar (10x10 cm/20x20 cm),

10/40 ml de cultivo del biosensor crecido hasta fase estacionaria y 40/160 μ l de X-Gal (40 mg/mL). Finalmente, se vertió la mezcla sobre la placa TLC que previamente fue colocada en placas de Petri cuadradas del tamaño adecuado. Se incubó durante 48 horas a 28 °C o hasta la aparición de las manchas correspondientes.

3.5.5.- Análisis por HPLC

Todos los análisis por HPLC fueron llevados a cabo en colaboración con el grupo del Profesor Antonio Gil Serrano, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla. Estos análisis se usaron con dos finalidades, por un lado para la separación por fraccionamiento de los extractos de sobrenadantes para su posterior cuantificación y, por otro lado, para la determinación química de los AI mediante espectrometría de masa. En ambos casos, se crecieron los rizobios en 500 ml de medio YM durante 6 días en agitación y a 28 °C, suplementados, cuando fue necesario, con flavonoides. Los cultivos se centrifugaron y los sobrenadantes se extrajeron dos veces con 1 volumen de diclorometano. Se tomó la fase orgánica y se evaporó hasta sequedad. Los extractos se disolvieron en 1 ml de metanol:agua (1:1 v/v) conteniendo 0,1% (v/v) de ácido fórmico, se microfiltraron (0,2 μ m) y se inyectaron 20 μ l en el sistema HPLC equipado con una columna Tracer Hyperyl ODS (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 μ m) (Teknokroma). La elución se llevó a cabo a temperatura ambiente con una tasa de flujo de 400 μ l min⁻¹ usando un gradiente de metanol agua, ambos acidificados con 0,1% de ácido fórmico (Morin *et al.*, 2003).

Los análisis de HPLC fueron llevados a cabo en un sistema de HPLC Waters Alliance 2695 (Waters) acoplado a un colector de fracciones Gilson FC203B (Gilson) para los ensayos de cuantificación en microplacas mediante actividad β -galactosidasa con el biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) (mirar más abajo). Las fracciones recogidas fueron de 1ml. En el caso de los análisis de HPLC acoplados a espectrometría de masas se usó un sistema de HPLC Perkin-Elmer Series 200 (Waltham).

3.5.5.1.- Separación y cuantificación de AI

Para cuantificar la producción de AI tras el fraccionamiento por HPLC se usaron los ensayos de actividad β -galactosidasa con el biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4). Las fracciones de 1 ml obtenidas mediante HPLC se evaporaron bajo flujo de aire para eliminar todo el metanol y se reajustó el volumen de cada fracción a 1ml con agua estéril. Los experimentos se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos de poliestireno con fondo en U (Greiner Bio-One). Como se describe en el apartado 3.2.2. se añadieron alícuotas de 100 μ l de cada fracción a los pocillos de la placa que contenían 100 μ l de cultivo de *A.tumefaciens* NT1 (pZRL4) en fase logarítmica ($DO_{660} = 0,4-0,6$). Como controles se añadieron 100 μ l de agua destilada estéril y 100 μ l de patrones de AHL a diferentes concentraciones a pocillos con el biosensor. Tras incubar la placa 4 días a 28 °C, se midió la absorbancia de cada pocillo de la placa con un lector de placas automático OASYS UVM 340 (Anthos Labtec Instruments). Se tomaron 40 μ l de cada uno de los pocillos y se colocaron en una nueva placa microtítulo, en la que se llevaron a cabo los experimentos de actividad β -galactosidasa usando el protocolo adaptado de Miller, y teniendo en cuenta que en lugar de cloroformo se usó tolueno, para evitar la degradación de la placa.

3.5.5.2.- Determinación estructural de los AI mediante espectrometría de masas

El estudio de la estructura química de las moléculas autoinductoras producidas por cada bacteria se llevó a cabo mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (MS/MS) en tándem (Cataldi *et al.*, 2009, Ortori *et al.*, 2007) en colaboración con el grupo del Profesor Antonio Gil Serrano, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla. Multiple-Reaction ion Monitoring (MRM) es un método en tándem de MS/MS en el que los iones específicos seleccionados son transmitidos a través del primer analizador (un cuadrupolo, Q1) y los fragmentos específicos seleccionados resultantes de la descomposición inducida por colisión (CID) en Q2 son introducidos en un segundo analizador (Q3). Esta técnica es adecuada para la identificación y el estudio de componentes de mezclas complejas de sustancias, como es el caso de los sobrenadantes bacterianos que contienen

normalmente una mezcla de diferentes AI. Es necesario que tanto los iones precursores (normalmente el ion pseudomolecular, $[M+H]^+$) como los iones producto sean indicados previamente al inicio de los análisis. Además, los compuestos a identificar deben haber sido bien caracterizados antes de llevar a cabo este tipo de identificación química. En nuestro caso, la familia de las AHL tiene en común el anillo lactónico. La fragmentación mediante CID genera un producto común en m/z 102, que corresponde al átomo de nitrógeno NH_3^+ del anillo lactónico, junto con iones productos correspondientes a $[M+H-101]^+$. Además, todas las AHL muestran picos pseudomoleculares en $[M+H]^+$ cuando el electrospray es llevado a cabo en modo positivo. La tabla 4.1. resume los valores usados en el análisis de HPLC-MS/MS.

Un segundo método, el ion precursor, fue usado como técnica complementaria para registrar aquellos compuestos que generan fragmentos en m/z 102 en Q3. Esta técnica es complementaria al MRM, ya que permite detectar compuestos que no están incluidos en la lista MRM Q1/Q3 (Makemson et al., 2006). Además de los métodos de identificación química citados, se verificaron las estructuras de las AHL detectadas por comparación del espectro de masas de los estándares según el método de potenciamiento de la producción de iones (EPI).

Todos los experimentos de espectrometría de masas fueron llevados a cabo en un espectrómetro de masas 2000 QTRAP hybrid triple-quadrupole-linear trap (Applied Biosystem) equipado con una fuente turbo de iones usados con el modo de electrospray de iones positivos.

3.6.- Técnicas para el estudio de la interferencia del QS bacteriano

3.6.1.- Obtención de material vegetal: exudados de semillas y raíces, extractos de semilla y raíces de plantas

Las semillas de *Oryza sativa* cv. Puntal y de *Phaseolus vulgaris* cv. BBL fueron desinfectadas superficialmente, germinadas y colocadas en los tubos de ensayo con rejilla como previamente se ha descrito. Las plantas de arroz y judía fueron crecidas

bajo condiciones controladas en cámaras de cultivo de plantas iluminadas usando como solución nutritiva de Rigaud-Puppo con nitrógeno (KNO_3). Las condiciones aplicadas fueron 18 horas de luz con 25 °C de temperatura y 60% de humedad; y 6 horas de oscuridad con 22 °C de temperatura y 70% de humedad. Para la obtención de exudados de semillas, tras desinfectar 1 g de semillas se sumergieron en 5 ml de agua destilada estéril durante 16 horas a 4 °C. Para la obtención de exudados de raíz, se tomó la solución nutritiva de las plantas tras su crecimiento durante 10 días. En el caso de los extractos de semillas, las semillas de ambas plantas fueron desinfectadas como previamente se ha descrito, congeladas con nitrógeno líquido y machacadas hasta polvo. Por cada gramo de polvo de semilla se añadieron 5 ml de una mezcla metanol:agua (1:1 v/v), y se dejó durante 16 horas a 4 °C en agitación. Por último, las raíces de plantas se obtuvieron en los mismos ensayos en los que se obtuvieron los exudados de raíz. En todos los casos, se llevaron a cabo controles de contaminación tomando 100 µl de los exudados o extractos vegetales y cultivándolos en placas de Petri con TY a 28 °C.

3.6.2.- Ensayos para la detección de moléculas que interfieren en el QS bacteriano

Los biosensores *C. violaceum* CV026, *E. coli* JM109 (pSB536) y *E. coli* JM109 (pSB536) (pME6863) se crecieron durante 12 horas en agitación y los biosensores *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) se crecieron durante al menos 48 horas en agitación. En el caso de los 3 primeros biosensores, se añadieron 200 µl de cultivos bacterianos crecidos a 4 ml de LB con 0,8% de agar. En el caso concreto de los ensayos reversos con *C. violaceum* CV026, se añadieron, además, 30 µl de C6-HSL (5 µg/ml). Para *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863), 400 µl de cultivo bacteriano en fase logarítmica de crecimiento se mezclaron con 4 ml de YM con 0,8 % de agar y se añadieron 40 µl de X-gal (40 mg/mL). Para la detección de moléculas que interfieren en el QS bacteriano se llevaron a cabo ensayos similares a los realizados para la detección de AI bacterianos (apartado 3.5.2.). En cada pocillo se añadieron 200 µl de muestra, tanto para exudados de semilla o raíz, como para extractos de semilla. En el caso de ensayos con raíces, se separó asépticamente el tallo de la raíz y ésta se colocó en placas de Petri con el medio de cultivo adecuado para cada biosensor. Acto seguido se añadió el agar de cobertera con

el biosensor ensayado. En los ensayos para ver el efecto del pH sobre los compuestos que interfieren en el QS producidos por las plantas, se añadieron 100 µl de extractos de semilla más 100 µl de agua destilada estéril a pH7 o 100 µl de extractos de semilla más 100 µl de tampón Tris-HCl 1M pH 9,5.

3.6.3.- Cromatografía en capa fina (TLC)

Los extractos de semilla de arroz y judía se analizaron también mediante TLC usando a los biosensores *A.tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863). La metodología fue similar a la aplicada en los estudios de AI bacterianos (apartado 3.5.3.), con la salvedad de que no se evaporaron los extractos, sino que directamente se añadieron 40 µl de cada muestra.

3.6.4.- Análisis por HPLC

Este apartado se realizó en colaboración con el grupo del profesor Antonio Gil Serrano, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla

3.6.4.1.- Separación y cuantificación de moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano

Se realizaron con extractos de judía BBL y extracto de arroz Puntal. En primer lugar, los extractos se filtraron con lana de vidrio para eliminar los precipitados existentes y se concentraron a sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente. El residuo resultante se redisolvió en agua y se liofilizó. Los residuos secos se redisolviéron en metanol 50% (Ex. judía: 5 ml y Ex. Arroz: 6 ml) y se procedió al fraccionamiento en cartuchos de SPE-C18 (Teknokroma, 1000 mg/6 ml). El procedimiento empleado fue el siguiente:

- 1.- Se limpió el cartucho con agua (3 x 5 ml). Se desechó el agua.
- 2.- Se lavó el cartucho con metanol (3 x 5 ml). Se desechó el metanol.

3.- Se acondicionó el mismo con metanol 50% (3 x 5 ml). Se desecha el metanol 50%.

4.- Se pasó a través del cartucho la muestra que previamente se había disuelto en metanol 50%. Esta fracción se recogió y corresponde al control (**A**).

5.- Se eluyeron las moléculas que IQS con disoluciones de metanol-agua en distintas proporciones: metanol 50% (3 x 5 ml) (**B**), metanol 60% (3 x 5 ml) (**C**), metanol 70% (3 x 5 ml) (**D**), metanol 80% (3 x 5 ml) (**E**), metanol 90% (3 x 5 ml) (**F**), metanol 100% (3 x 5 ml) (**G**).

Un tercio del volumen de las fracciones recogidas (**A** a **G**), es decir, 5 ml de cada una de ellas a excepción de **A** que se toma un volumen de 1,5 ml, se pasaron a tubos de ajuste y se concentraron a sequedad en el rotavapor a temperatura ambiente. Por último, las fracciones recogidas se resuspendieron en 500 µl de agua milliQ. Estas muestras se usaron para la cuantificación de las moléculas que IQS producidas por plantas de arroz y judía.

Los ensayos de cuantificación de las moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano se llevaron a cabo usando a los biosensores *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) a partir de las fracciones de extractos de semilla obtenidas anteriormente. Los experimentos se realizaron en placas de 96 pocillos con fondo en U (Greiner Bio-One).

En primer lugar se añadió a cada pocillo 100 µl de una mezcla madre que consiste en 20 ml de YM(3) con agar al 1,2%, 10 ml de NT1 (pZRL4) o NT1 (pZRL4) (pME6863) en fase logarítmica de crecimiento ($DO_{660} = 0,4-0,6$) en medio YM(3) y 80 µl de X-gal (20 mg/mL). Una vez solidificados, en cada pocillo se añadieron 50 µl de cada fracción de extractos de semilla. Como control negativo se añadieron a los pocillos con biosensor 50 µl de agua destilada estéril. Como control positivo se añadieron 49 µl de agua destilada estéril y 1 µl del patron 3-oxo-C6-HSL a diferentes concentraciones (desde 100 ng/µl hasta 1,5 ng/µl). Acto seguido, se midió la absorbancia a 615 nm de cada pocillo de la placa con un lector de placas automático Synergy HT (BioTex). Tras incubar la placa 24 horas a 28 °C se volvió a medir la absorbancia a 615 nm en el mismo lector de placas automático. Los niveles de inducción del biosensor se obtienen midiendo el incremento de absorbancia a 615 nm tras el periodo de incubación.

3.6.4.2.- Determinación estructural de moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano mediante espectrometría de masas

La determinación estructural de las moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano consistió en determinar la presencia de moléculas de tipo AHL, y se llevó a cabo mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas.

La separación cromatográfica se realizó con un sistema de HPLC Perkin Elmer Series 200 acoplado con un sistema híbrido QTRAP LC-MS/MS (Applied Biosystems MDS Sciex). El análisis por HPLC se llevó a cabo con una columna analítica en fase reversa (Zorbax Eclipse XDB-C18, 2,1 x 150 mm, 3,5 μm). El flujo empleado fue de 250 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. La separación cromatográfica se realizó usando un gradiente binario de agua (A) y metanol (B), conteniendo ambos eluyentes ácido fórmico al 0,1% (v/v) para favorecer la ionización.

La elución tuvo lugar utilizando diferentes mezclas de metanol-agua. El perfil de elución consistió en: isocrático durante 5 minutos con B al 50%, lineal durante 15 minutos hasta alcanzar el 90% de B, isocrático durante 5 minutos con B al 90% y, por último, isocrático durante 5 minutos con B al 50%.

Para el estudio estructural de las posibles AHL presentes se han usado dos tipos de experimentos MS/MS, el experimento Ion Precursor, que consiste en fijar un ion producto en Q_3 y únicamente registrar el ion pseudomolecular del que procede. El ion producto que se ha fijado en el caso de las AHL es el ion a m/z 102,1, que es uno de los más intensos porque proviene de una rotura preferente y se encuentra presente en todas las estructuras posibles de las AHL; y el método MRM (Multiple Reaction Ion Monitoring), en el que se selecciona con el primer cuadrupolo un ion precursor y se elige un ion producto con el tercer cuadrupolo, procedente de una o varias fragmentaciones características. Sólo cuando se observe esa fragmentación particular se registrará señal.

Los patrones de AHL empleados tanto para la optimización del método cromatográfico como del método de masas fueron: C4-AHL (pureza 98,7%), C6-AHL (pureza 98,7%), C7-AHL (pureza 97,6%), C8-AHL (pureza 99,5%), C10-AHL (pureza 99,3%), C12-AHL (pureza 97,3%), C14-AHL (pureza 99,1%), 3-oxo-C6-AHL (pureza 99,0%), 3-oxo-C8-AHL (pureza 99,0%), 3-oxo-C10-AHL (pureza, 100%), 3-oxo-C12-

AHL (pureza, 99,0%), 3-oxo-C14-AHL (pureza 99,0%), 3-OH-C12-AHL (pureza 98,1%) y 3-OH-C14-AHL (pureza 96,8%) adquiridos de la casa comercial Sigma-Aldrich S.A.

3.7.- Técnicas microscópicas

Todas las técnicas microscópicas se realizaron en colaboración con el grupo del Profesor Javier Lloret Romero del Departamento de Biología de la Universidad Autónoma de Madrid.

3.7.1.- Microscopía confocal

La microscopía confocal se usó para los estudios de formación de biofilm suplementarios a los que se llevaron a cabo en placas microtítulo. Para ello, a las estirpes a ensayar se les introdujo un plásmido que porta los genes que codifican para la proteína fluorescente verde (EGFP-1) (Stuurman *et al.* 2000). Estas estirpes marcadas con la proteína fluorescente verde se cultivaron durante 2 días a 28 °C en el medio MGM bajo en fosfato suplementado con los antibióticos adecuados. Transcurrido este tiempo, se midió la densidad óptica a 600 nm y se llevaron a cabo las diluciones oportunas hasta un valor de $D.O_{600} \approx 0,2$ en un volumen final de 400 μ l del mismo medio de cultivo (suplementado con el flavonoides en el caso en el que se requirió). El cultivo de las bacterias se llevó a cabo en las cámaras de 8 pocillos Lab-Tex Chamber Slide System (Thermo Fisher Scientific Inc.) durante 4, 7 y 11 días a 28 °C y sin agitación (soporte cristal). En cada uno de estos tiempos se llevó a cabo la captura de imágenes mediante el microscopio confocal espectral Leica TCS SP2. Para el tratamiento *in silico* de reconstrucción 3D de las imágenes obtenidas se usó el programa informático Bitplane, de Imaris software.

3.7.2.- Microscopía de epifluorescencia

Los experimentos de microscopía de epifluorescencia se usaron para estudiar la colonización de raíces de soja por las diferentes estirpes bacterianas. Al igual que en el

caso de la microscopía confocal, las bacterias fueron marcadas previamente con el plásmido que lleva el gen de la proteína fluorescente verde. Para llevar a cabo los experimentos de colonización, las semillas de soja fueron desinfectadas, germinadas, crecidas e inoculadas mediante el sistema descrito anteriormente. Tras los 7 días de crecimiento y para evitar la autofluorescencia de las raíces, éstas se sumergieron durante 3 minutos en cristal violeta al 0,5%. Acto seguido se sometieron a 3 lavados de 5 minutos con agua destilada estéril, se colocaron las raíces en un portaobjetos y se taparon con cubreobjetos. La toma de imágenes se llevó a cabo con el microscopio de epifluorescencia Olympus BH2-FRCA con una cámara Leica MTV-3.

3.7.3.- Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La microscopía electrónica de barrido se usó como método complementario a la microscopía de epifluorescencia para estudiar la colonización de raíces de soja por las diferentes estirpes bacterianas. Los experimentos de colonización se llevaron a cabo con plantas de soja desinfectadas, germinadas, crecidas e inoculadas mediante el sistema descrito anteriormente.

Para cada planta y bacteria, se cortó 1 cm de raíz de las regiones apical, anterior y lateral y se colocó en eppendorf de 2 ml. En cada eppendorf se añadieron 2 ml de una solución de glutaraldehído (2,5%) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 minutos. Tras esto, se retiró la solución y se añadieron 2 ml de solución de cacodilato sódico y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Este paso se repitió una vez más. La deshidratación progresiva se llevó a cabo sumergiendo las muestras cada 20 minutos en etanol al 10%, 30%, 50%, 70%, 90% y 100% (v/v). Una vez concluida la deshidratación, se guardaron las muestras en etanol 100% a 4 °C. Por último, se montaron las muestras en portaobjetos especiales para MEB y se introdujeron en una cámara que suministró CO₂ líquido (a 0 °C) y mediante centrifugación se reemplazó el etanol por el CO₂. Tras el intercambio se incrementó la temperatura hasta los 40 °C, convirtiéndose así el CO₂ en gas, que pasa a la atmósfera. El último paso, fue aplicar una capa de oro por electrolisis en una cámara de vacío. La toma de imágenes se llevó a cabo con el MEB Philip XL30.

Soluciones utilizadas en la preparación de muestras para el MEB

Cacodilato sódico	32 g/l
Glutaraldehído	Glutaraldehído comercial (25%) : Cacodilato sódico 1:9 (v/v)

El pH de la solución de cacodilato sódico 0,2 M se ajustó a pH 7,1 con HCl.

3.8.- Análisis estadístico

Los datos para el análisis de los fenotipos simbióticos (número de nódulos, peso fresco de nódulos y peso seco de la parte aérea de las plantas), así como para el análisis de los valores de producción total de AI en presencia de diferentes flavonoides, fueron sometidos a un análisis de varianza no paramétrico, mediante el test de Mann-Whitney, con un nivel de significación (α) de 5 ó 1%.

RESULTADOS

CAPÍTULO I:

ESTUDIO DE LOS SISTEMAS DE QUORUM SENSING BACTERIANO

4.1.- Caracterización de los sistemas de QS

En este primer punto de la Tesis se abordó el estudio de los sistemas de QS de tres bacterias de la familia *Rhizobiaceae* con diferentes rangos de nodulación: *S. fredii* SMH12, bacteria de amplio rango de hospedador que nodula con decenas de leguminosas diferentes, *R. etli* ISP42 que nodula con diversas plantas, principalmente con diferentes variedades de judía, y *R. sllae* IS123, que únicamente nodula con *Hedysarum coronarium*. Para ello se estudió el perfil de AI producidos por las tres bacterias y se buscaron algunos de los genes de síntesis de AI presentes en sus respectivos genomas.

4.1.1.- Detección y cinética de producción de AI

Para la detección de AI es necesario el uso de biosensores bacterianos que detectan *in vivo* la presencia de una serie de AHL. Los sobrenadantes de las tres estirpes fueron ensayados en placas con pocillos usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4). Los resultados indicaron que los sobrenadantes de los 3 rizobios estudiados poseen moléculas de tipo AI cuando se cultivan en medios TY y YM(3). Esta producción fue mayor a los 6 y a los 9 días que a los 3 días de cultivo en las 3 estirpes en estudio y en ambos medios de cultivo. Cuando se usó el medio TY para el cultivo de las estirpes, la mayor inductora del biosensor fue SMH12, seguida de ISP42 y, por último, IS123 (Figura 4.1.A). Lo mismo parece ocurrir cuando se usó como medio de cultivo YM(3), si bien en este último caso las diferencias entre ISP42 y SMH12 no fueron tan acusadas (Figura 4.1.B). Las tres bacterias presentaron mayor producción en el medio YM(3) que en el medio TY.

Estos experimentos permitieron establecer al medio YM(3) como el medio de cultivo para la obtención de sobrenadantes bacterianos tras 6 días de crecimiento de las tres bacterias estudiadas.

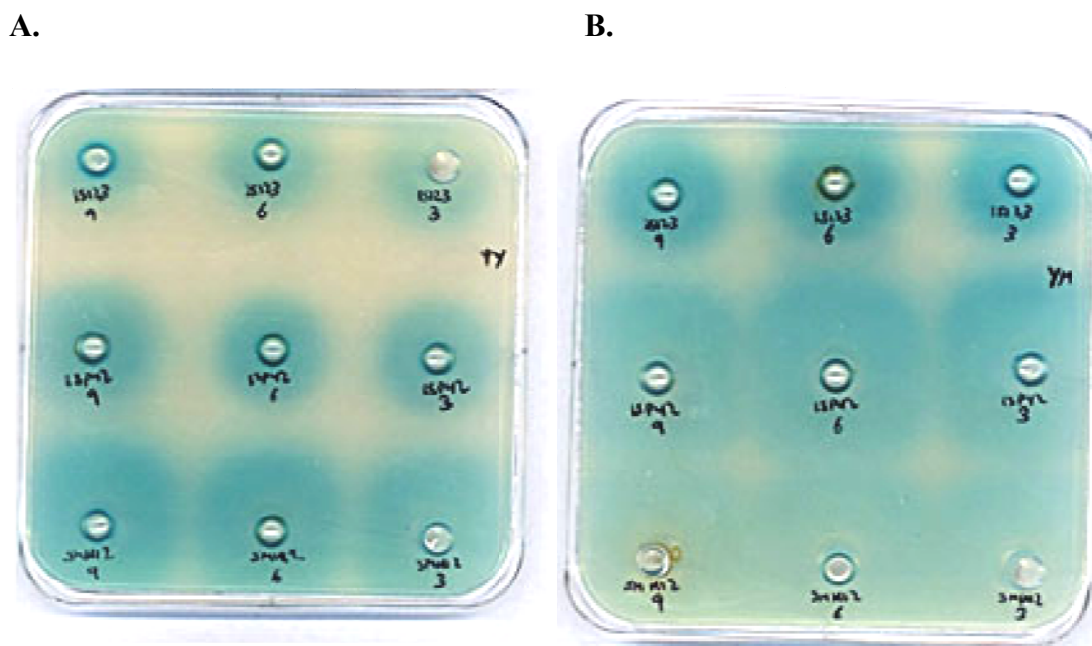


Figura 4.1. Detección y cinética de producción de AI. Bioensayo de presencia de AI en sobrenadantes de cultivos bacterianos de las tres bacterias crecidas en medio TY (A) y medio YM(3) (B) tras 3,6 y 9 días de crecimiento.

4.1.2.- Cromatografía en capa fina (TLC)

Las tres bacterias son productoras de AI detectables mediante el biosensor *A.tumefaciens* NT1 (pZRL4). Sin embargo, para conocer el número mínimo de AI producidos por cada una de ellas es necesaria la separación de éstos mediante cromatografía en capa fina usando de nuevo al biosensor *A.tumefaciens* NT1 (pZRL4) para revelar las placas. En el caso de SMH12, se cargaron extractos equivalentes a 100 μ l de sobrenadante y en el caso de ISP42 y IS123 se cargaron extractos equivalentes a 1 ml de sobrenadante. El revelado de la cromatoplaaca con el biosensor mostró que *Sinorhizobium fredii* SMH12 produce al menos 4 tipos de AI diferentes (Figura 4.2.A), *Rhizobium etli* ISP42 al menos 3 (Figura 4.2.B) y *Rhizobium sullae* IS123 al menos 2 (Figura 4.2.C). La observación de la movilidad de los patrones (Figura 4.2.D y E) indicó que aquellas AHL con mayor número de carbonos en la cadena lateral tienen menor migración a lo largo de la cromatoplaaca. Así, en el carril D la mancha inferior corresponde a la C10-HSL, la intermedia a la C8-HSL y la superior a la C6-HSL. Por otro lado, en el carril E, únicamente está presente la 3-oxo-C6-HSL, que presenta una movilidad superior a la propia C6-HSL, lo que también ocurre con el derivado 3-oxo-C8-HSL (datos no mostrados). Por todo esto, parece ser que cada una de las tres estirpes

en estudio produce dos AI con movilidad similar a la C8-HSL y derivados. En el caso de ISP42 y SMH12, además, se produce un AI con movilidad inferior al patrón C10-HSL. En SMH12 aparece un cuarto AI con movilidad similar a la 3-oxo-C6-HSL.

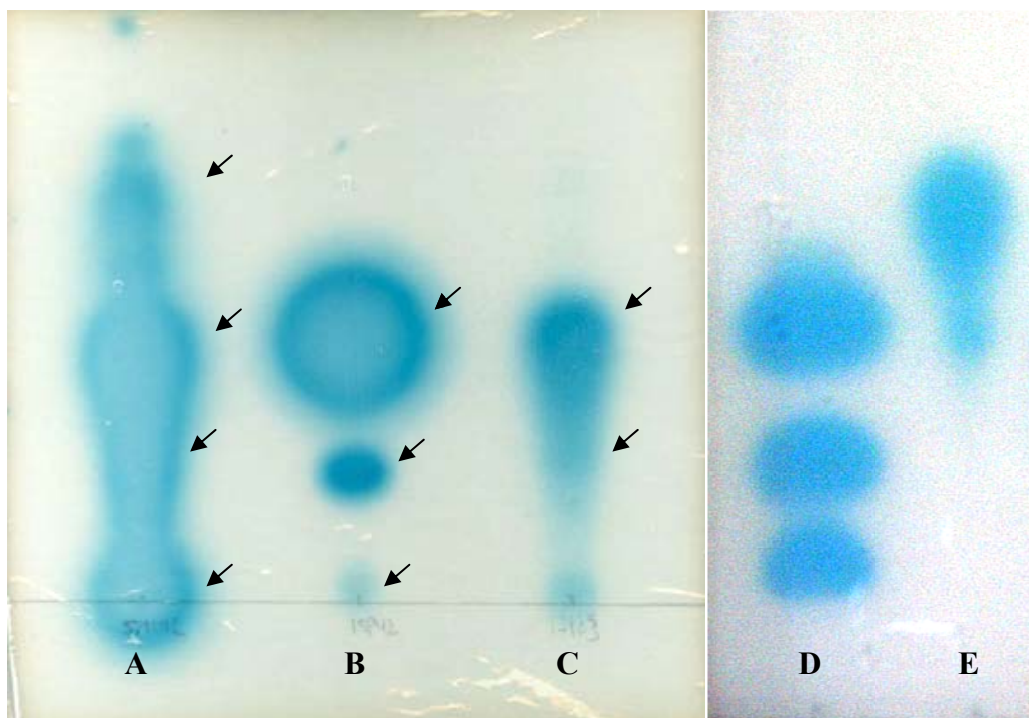


Figura 4.2. Cromatografía en capa fina de los extractos de las tres estirpes silvestres de rizobios. SMH12(A), ISP42(B) y IS123(C). Se utilizaron cromatoplasmas de fase reversa C_{18} y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles se usaron las AHL comerciales C10-HSL (D inferior), C8-HSL (D intermedia), C6-HSL (D superior) y la 3-oxo-C6-HSL (E). Con flechas están señaladas las manchas correspondientes a los diferentes AI.

Estos experimentos indican que SMH12 produce al menos 4 AI diferentes, ISP42 al menos 3 e IS123 al menos 2.

4.1.3.- Análisis estructural de los AI

Como se indicó en Materiales y Métodos, la identificación química de las moléculas AI en las tres estirpes en estudio se llevó a cabo mediante HPLC acoplada a un método de espectrometría de masas en tándem, el multiple-reaction ion monitoring (MRM) gracias a la colaboración con el grupo del profesor Antonio Gil Serrano, de la Facultad

de Química de la Universidad de Sevilla. Los iones seleccionados en Q1 y Q3 usados en espectrometría de masas en tándem para la detección de las diferentes AHL se muestran en la Tabla 4.1. Los tiempos de retención para diferentes estándares analizados se encuentran recogidos en la Tabla 4.2. Un segundo método complementario, el ion precursor, se usó para identificar moléculas no detectadas mediante el MRM. Por último, se verificaron las AHL detectadas mediante la comparación de espectros de masas de estándares mediante la técnica EPI.

En *S. fredii* SMH12, los cromatogramas obtenidos tanto por el método MRM como por el método ion precursor mostraron la presencia de dos AHL (Figura 4.3.), una en el pico cromatográfico a 17,48 min y otra en el pico cromatográfico a 26,13 min. La comparación de los tiempos de retención y de los EPI de estos picos con los patrones indicó que el primero de ellos se corresponde con la 3-oxo-C8-HSL y el segundo con la C8-HSL (Figura 4.4. y Figura 4.5.). Los EPI de los demás picos cromatográficos encontrados no se corresponden con moléculas de tipo AHL. Estos picos son impurezas que provienen del propio medio de cultivo, ya que también se han encontrado en los medios control sin inocular.

Para ISP42, la espectrometría de masas determinó, tanto por el método MRM (Figura 4.6.) como por el del ion precursor, la presencia de tres picos cromatográficos: uno a los 19,75 min, otro a los 26,84 min y el último, a los 33,44 min (Figura 4.6.). La comparación de los tiempos de retención y de los EPI de estos picos con los patrones indicó que el primero de ellos se corresponde con la 3-OH-C8-HSL, el segundo con la C8-HSL y el último, con la 3-oxo-C14-HSL (Figura 4.7., Figura 4.8. y Figura 4.9.). Como ocurrió en SMH12, los demás picos cromatográficos son impurezas que provienen del propio medio de cultivo.

Por último, en *R. sultae* IS123 los cromatogramas obtenidos tanto por MRM como por ion precursor, mostraron la presencia de dos picos cromatográficos correspondientes a AHL, uno a los 18,45 min y otro a los 26,74 min (Figura 4.10.). La comparación de los tiempos de retención y de los EPI de estos picos con los patrones indicó que en el primero de ellos, aparece una mezcla de dos AHL, la 3-oxo-C8-HSL y la 3-OH-C8-HSL, mientras que el segundo se corresponde con la C8-HSL (Figura 4.11., Figura 4.12. y Figura 4.13.). Como anteriormente, los demás picos cromatográficos corresponden con impurezas del medio de cultivo.

Tabla 4.1. Iones seleccionados en Q1 y Q3 usados en espectrometría de masas en tándem (mediante MRM) para la detección de las diferentes AHL.

AHL	Q1	Q3
C4-HSL (<i>N</i> -butanoil-homoserina lactona)	172.2	102.1 / 71.2
3-oxo-C4-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-butanoil)-homoserina lactona)	186.2	102.1 / 85.2
C5-HSL (<i>N</i> -pentanoil-homoserina lactona)	186.2	102.1 / 85.2
3-oxo-C5-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-pentanoil)-homoserina lactona)	200.3	102.1 / 99.2
C6-HSL (<i>N</i> -hexanoil-homoserina lactona)	200.3	102.1 / 99.2
3-oxo-C6-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-hexanoil)-homoserina lactona)	214.3	102.1 / 113.2
C7-HSL (<i>N</i> -heptanoil-homoserina lactona)	214.3	102.1 / 113.2
3-oxo-C7-HSL (<i>N</i> -(3-oxo)heptanoil-homoserina lactona)	228.3	102.1 / 127.2
C8-HSL (<i>N</i> -octanoil-homoserina lactona)	228.3	102.1 / 127.2
3-oxo-C8-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-octanoil)-homoserina lactona)	242.3	102.1 / 141.2
3-OH-C8-HSL (<i>N</i> -(3-hidroxi-octanoil)-homoserina lactona)	244.3	102.1 / 143.2
C9-HSL (<i>N</i> -nonanoil-homoserina lactona)	242.3	102.1 / 141.2
3-oxo-C9-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-nonanoil)-homoserina lactona)	256.3	102.1 / 155.2
C10-HSL (<i>N</i> -decanoil-homoserina lactona)	256.3	102.1 / 155.2
3-oxo-C10-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-decanoil)-homoserina lactona)	270.3	102.1 / 169.2
C11-HSL (<i>N</i> -undecanoil-homoserina lactona)	270.3	102.1 / 169.2
3-oxo-C11-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-undecanoil)-homoserina lactona)	284.3	102.1 / 183.2
C12-HSL (<i>N</i> -dodecanoil-homoserina lactona)	284.3	102.1 / 183.2
3-oxo-C12-HSL (<i>N</i> -(3-oxo)dodecanoil-homoserina lactona)	298.3	102.1 / 197.2
3-OH-C12-HSL (<i>N</i> -(3-hidroxi-dodecanoil)-homoserina lactona)	300.3	102.1 / 199.2
C13-HSL (<i>N</i> -tridecanoil-homoserina lactona)	298.3	102.1 / 197.2
3-oxo-C13-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-tridecanoil)-homoserina lactona)	312.3	102.1 / 211.2
C14-HSL (<i>N</i> -tetradecanoil-homoserina lactona)	312.3	102.1 / 211.2
3-oxo-C14-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-tetradecanoil)-homoserina lactona)	326.3	102.1 / 225.2
C15-HSL (<i>N</i> -pentadecanoil-homoserina lactona)	326.3	102.1 / 225.2

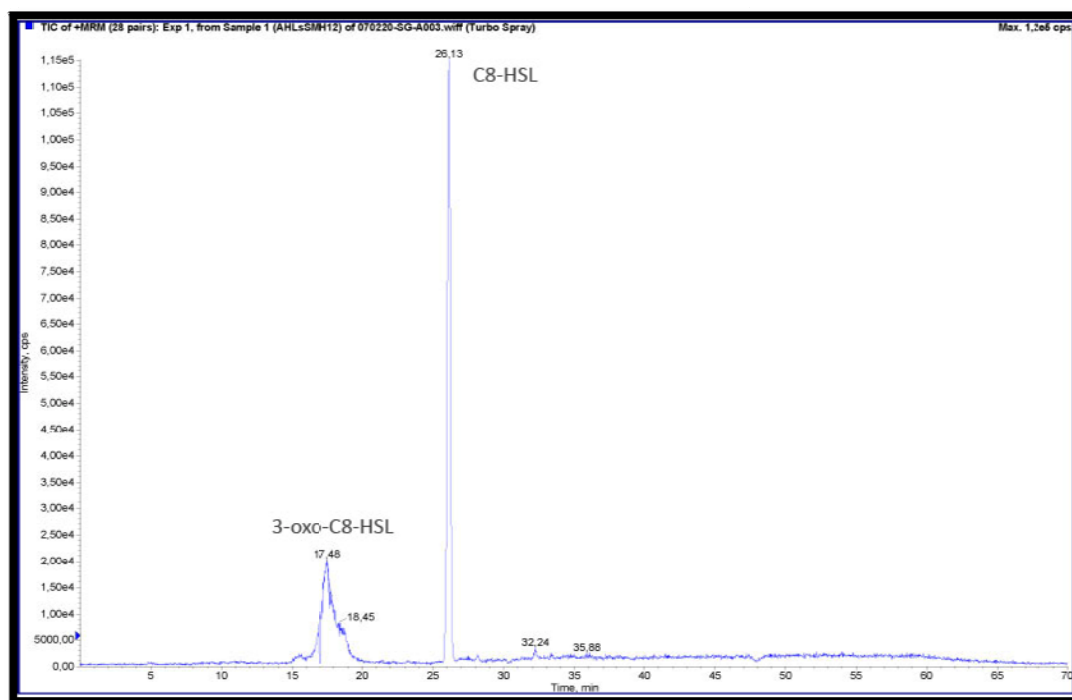


Figura 4.3. Cromatograma MRM de los AI aislados de SMH12. Se muestra la presencia de dos picos cromatográficos. El pico que de los 17,48 min corresponde a la 3-oxo-C8-HSL y el pico cromatográfico de los 26,13 min corresponde a la C8-HSL. Eje X: tiempo en minutos. Eje Y: intensidad en cuentas por segundo (cps).

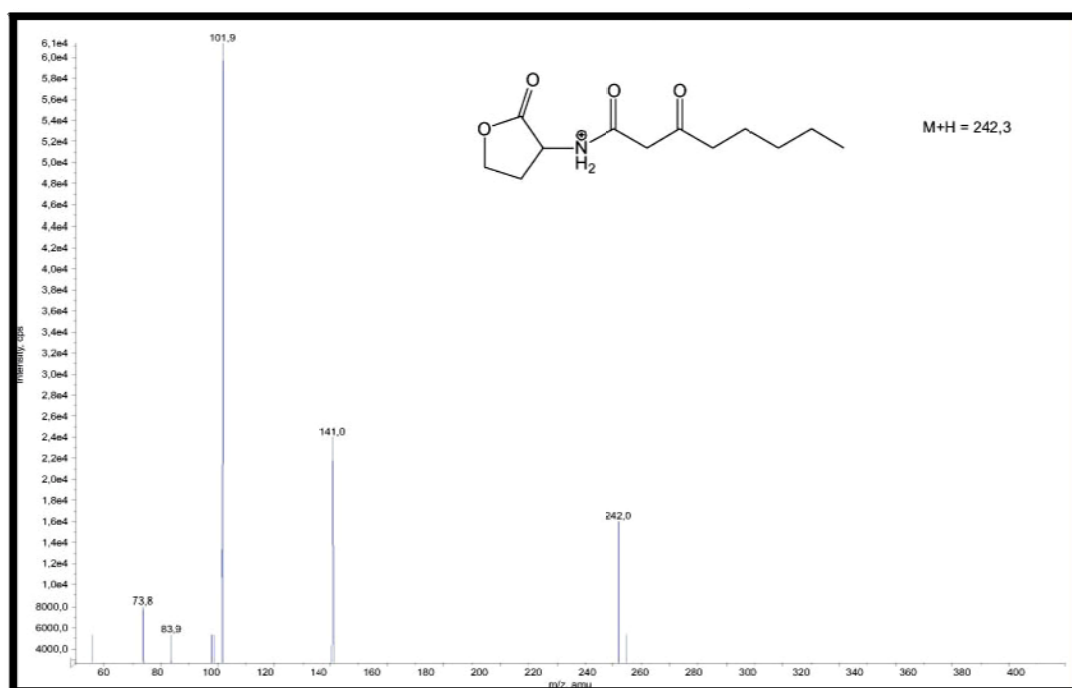


Figura 4.4. EPI del pico cromatográfico de SMH12 a los 17,48 minutos. El EPI se corresponde con el del patrón 3-oxo-C8-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

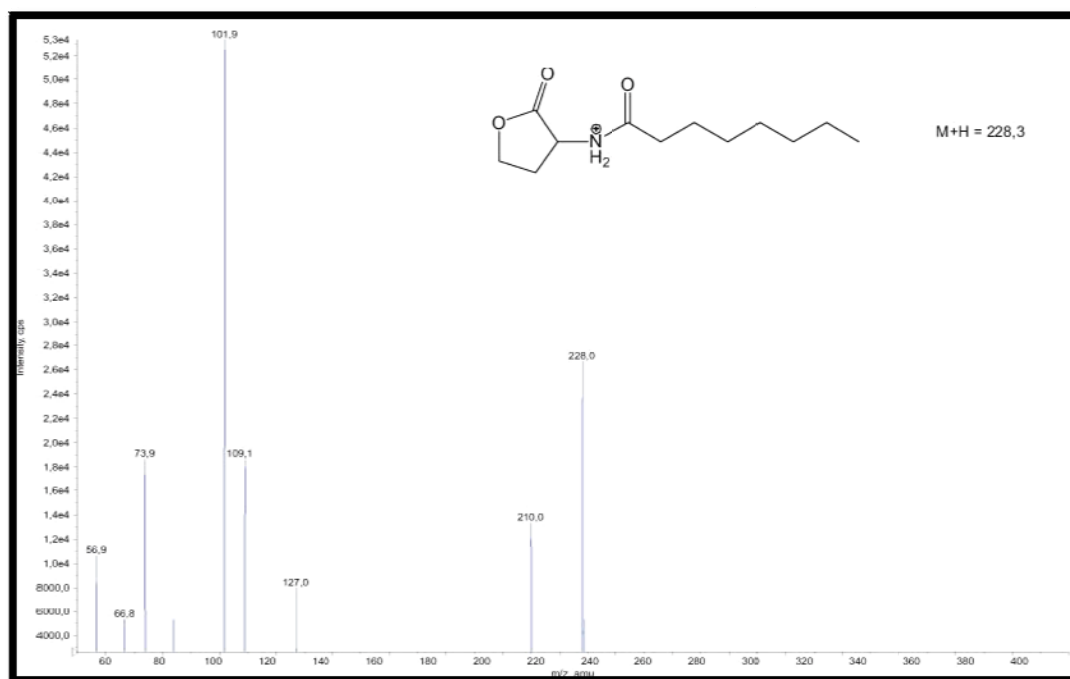


Figura 4.5. EPI del pico cromatográfico de SMH12 a los 26,13 minutos. El EPI se corresponde con el del patrón C8-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

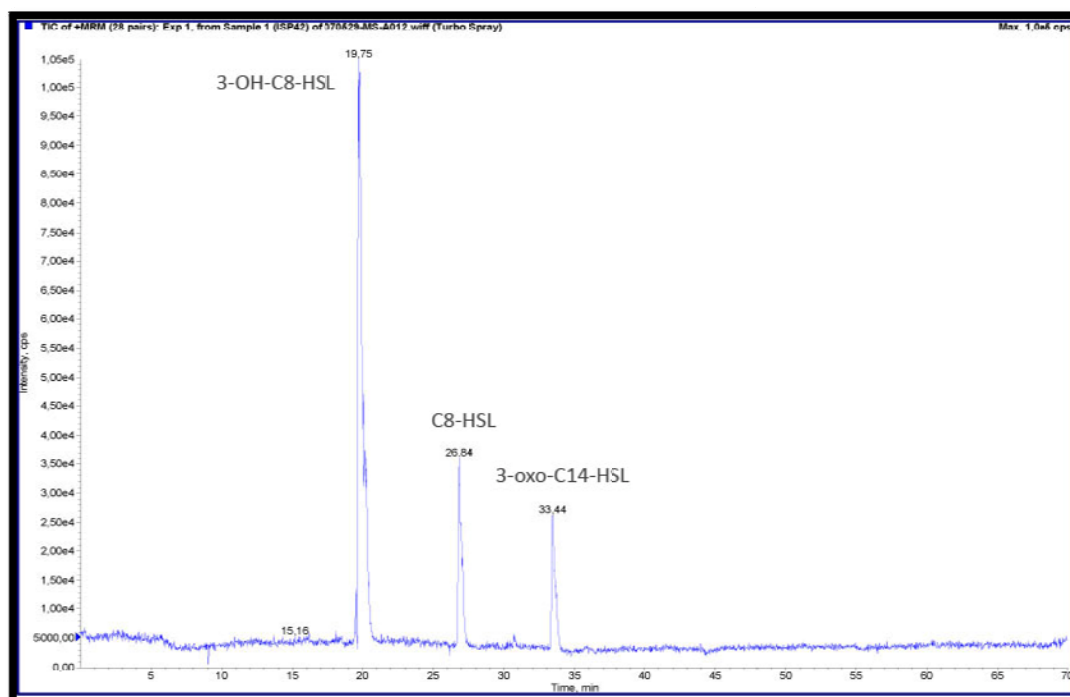


Figura 4.6. Cromatograma MRM de los AI aislados de ISP42. Se muestra la presencia de tres picos cromatográficos. El pico de los 19,75 min corresponde a la 3-OH-C8-HSL, el pico cromatográfico de los 26,84 min corresponde a la C8-HSL, y por último, el pico de los 33,44 min se corresponde con la 3-oxo-C14-HSL. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

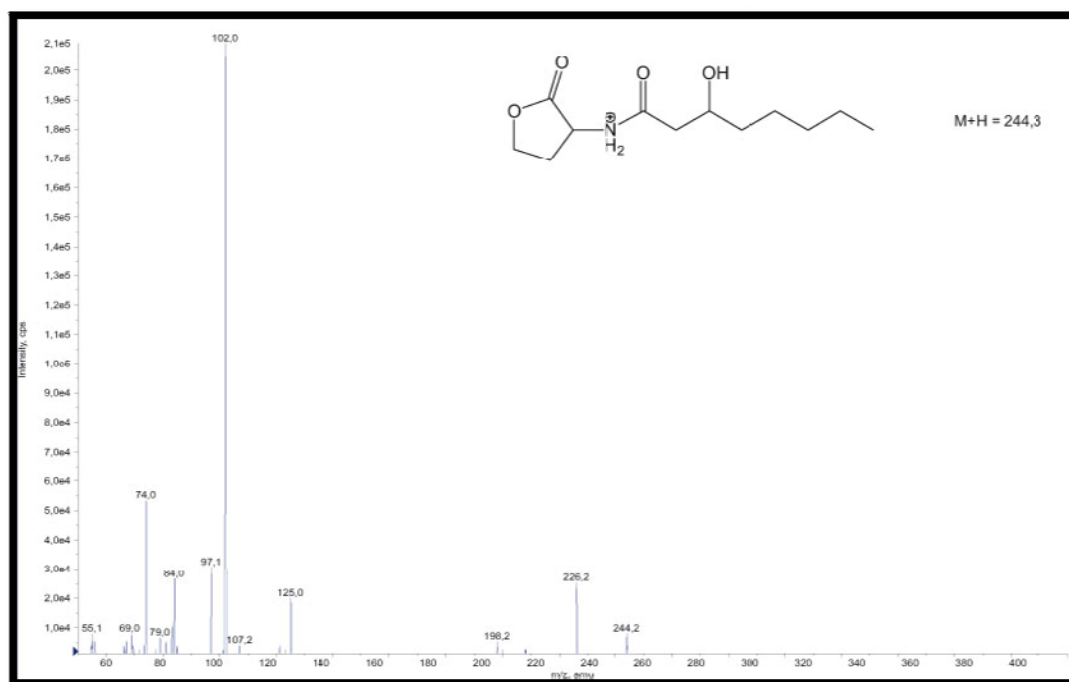


Figura 4.7. EPI del pico cromatográfico de ISP42 a los 26,84 minutos. El EPI se corresponde con el del patrón 3-OH-C8-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

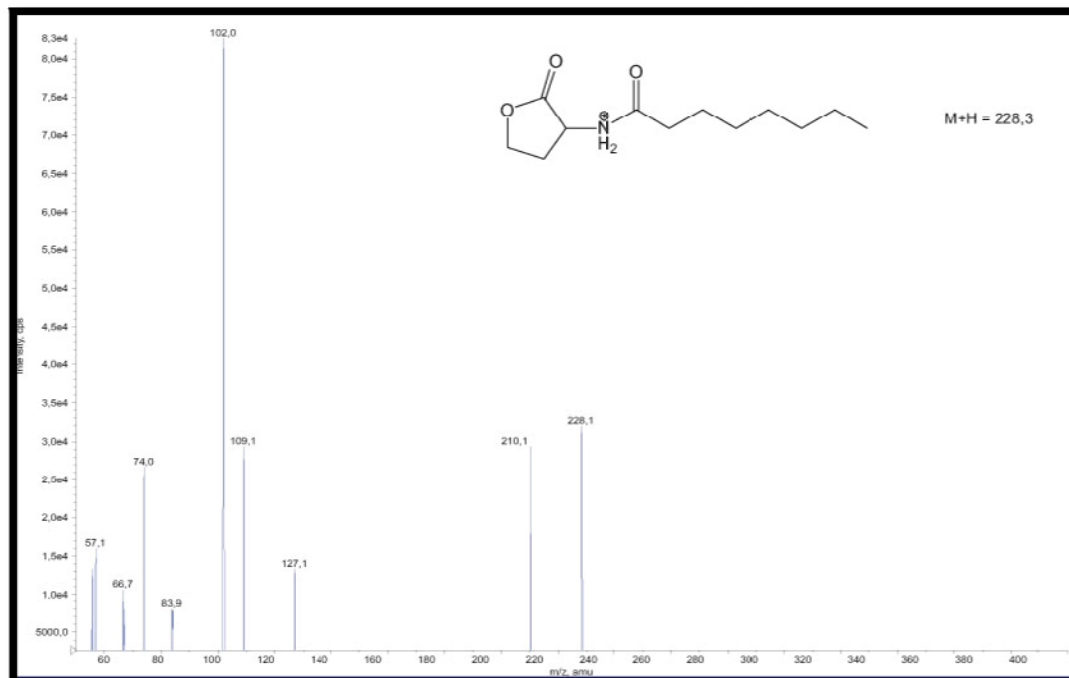


Figura 4.8. EPI del pico cromatográfico de ISP42 a los 19,75 minutos. El EPI se corresponde con el del patrón C8-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

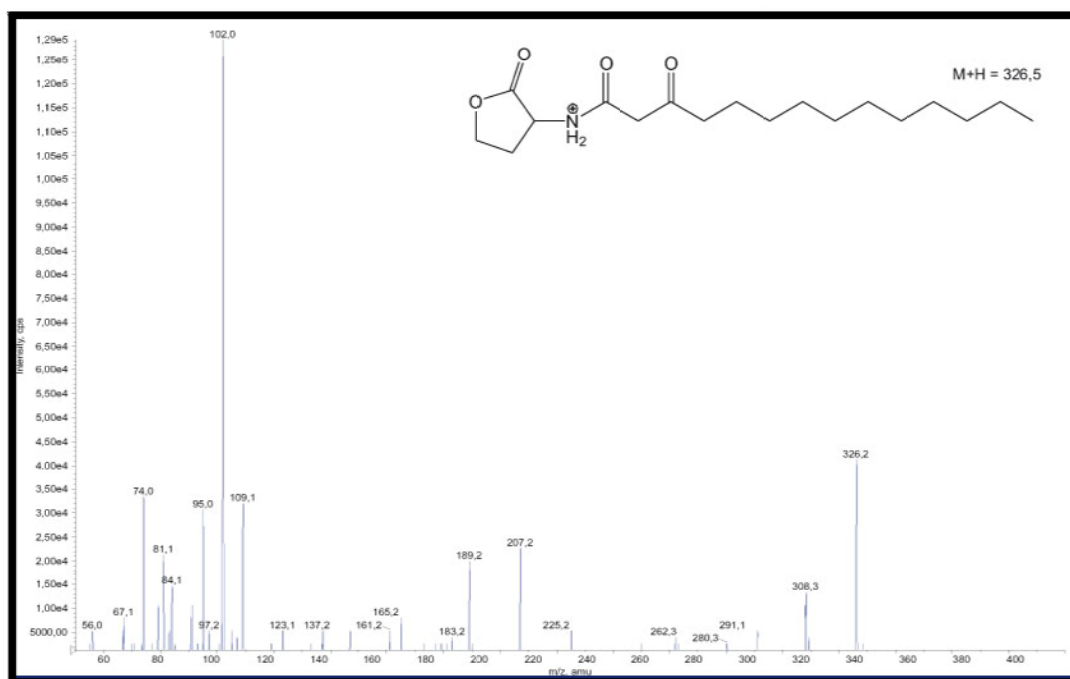


Figura 4.9. EPI del pico cromatográfico de ISP42 a los 33,44 minutos. El EPI se corresponde con el del patrón 3-OH-C14-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

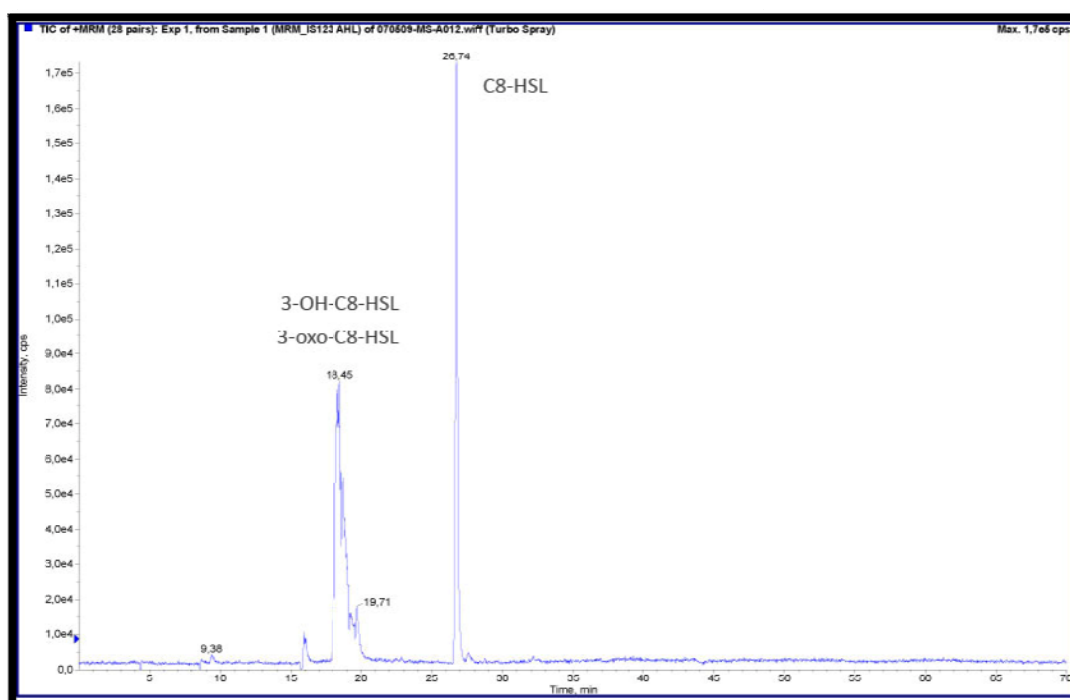


Figura 4.10. Cromatograma MRM de los AI aislados de IS123. Se muestra la presencia de dos picos cromatográficos. El pico de los 18,45 min corresponde a una mezcla de la 3-oxo-C8-HSL y la 3-OH-C8-HSL, y el pico cromatográfico de los 26,84 min corresponde a la C8-HSL. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

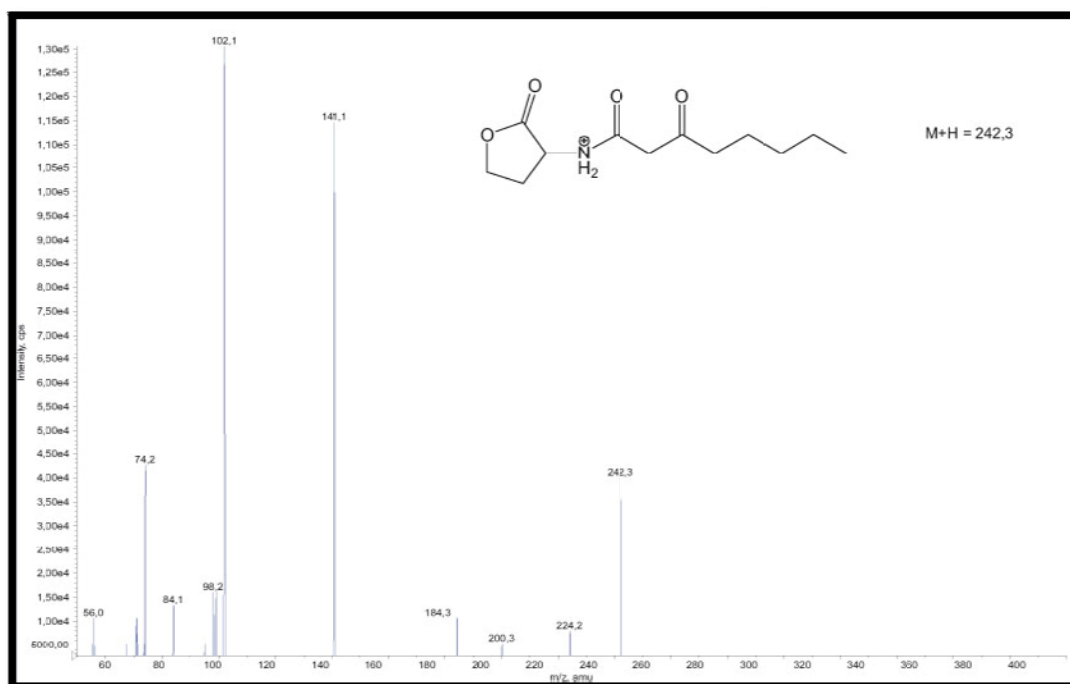


Figura 4.11. EPI del pico cromatográfico de IS123 a los 18,45 minutos (A). El EPI se corresponde con el del patrón 3-oxo-C8-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

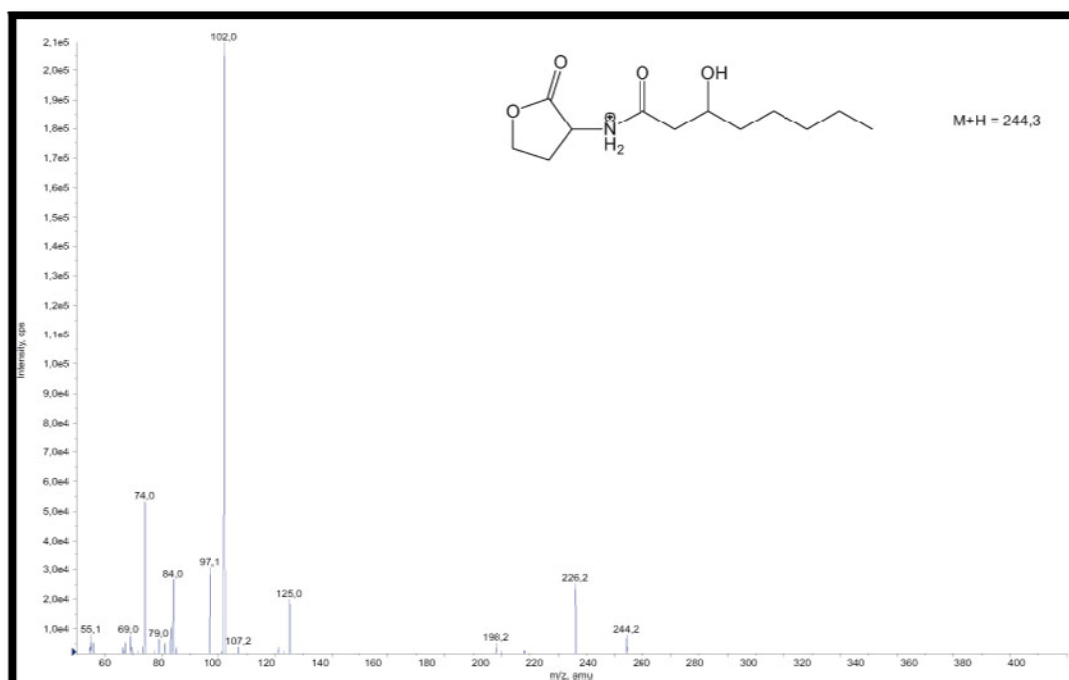


Figura 4.12. EPI del pico cromatográfico de IS123 a los 18,45 minutos (B). El EPI se corresponde con el del patrón 3-OH-C8-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

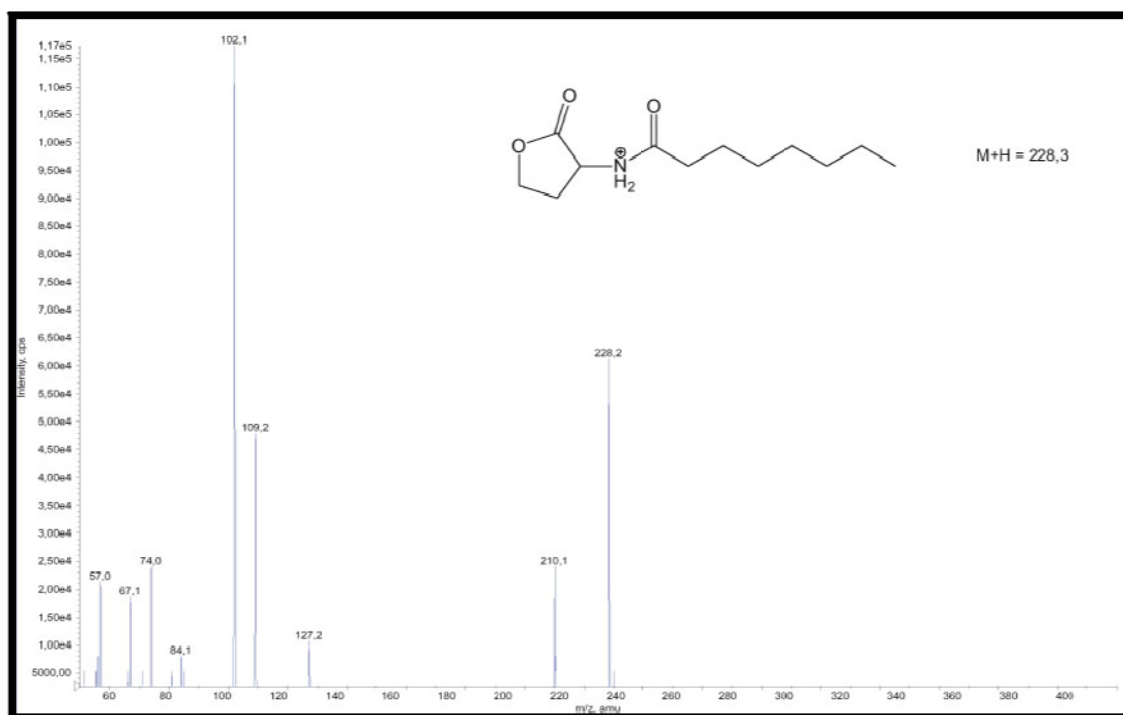


Figura 4.13. EPI del pico cromatográfico de IS123 a los 26,74 minutos. El EPI se corresponde con el del patrón C8-HSL. La estructura de la AHL detectada está representada en la figura. Eje X: tiempo (min). Eje Y: intensidad (cuentas por segundo).

Se utilizó un segundo método complementario a la determinación de la estructura química mediante espectrometría de masas para comprobar la actividad biológica de las AHL identificadas en los sobrenadantes de las tres bacterias estudiadas. Este método consiste en recoger las diferentes fracciones obtenidas de los extractos de sobrenadantes de las tres bacterias tras su paso por la HPLC para llevar a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa en placa microtítulo usando el biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4). Previamente, mediante ensayos de inducción con biosensores se calcularon empíricamente los tiempos de retención de los diferentes patrones disponibles tras su paso por la HPLC y se pudo determinar la fracción aproximada en la que se encontrarían estas moléculas AI (Tabla 4.2.).

En *S. fredii* SMH12 (Figura 4.14.A), las fracciones 5, 7-9, 12, 15 y 24-26 mostraron niveles más altos de inducción. En el caso de *R. etli* ISP42 (Figura 4.14.B), el incremento de inducción se apreció claramente en las fracciones 6-8, 12, 14-17 y 24-26. Por último, en *R. sultae* IS123 (Figura 4.14.C), el incremento se detectó en las fracciones 5, 8-10, 12-13, y 25.

Tabla 4.2. Tiempos de retención y fracción aproximada para diferentes AHL patrones tras su paso por HPLC.

AHL	tr (min)	Fracción aprox.
C4-HSL (<i>N</i> -butanoil-homoserina lactona)	9,2	3-4
C6-HSL (<i>N</i> -hexanoil-homoserina lactona)	16,8	6-7
3-oxo-C6-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-hexanoil)-homoserina lactona)	9,7	3-5
C8-HSL (<i>N</i> -octanoil-homoserina lactona)	26,6	11-12
3-OH-C8-HSL (<i>N</i> -(3-hidroxi-octanoil)-homoserina lactona)	19,0	7-9
C10-HSL (<i>N</i> -decanoil-homoserina lactona)	31,2	12-13
C12-HSL (<i>N</i> -dodecanoil-homoserina lactona)	34,2	13-14
C14-HSL (<i>N</i> -tetradecanoil-homoserina lactona)	38,7	15-17

Los tiempos de retención (tr) para algunos estándares están indicados en la columna del medio.

Cada fracción (1ml) tarda aproximadamente 2,5 min en obtenerse, por lo que la fracción aproximada en la que eluyen los diferentes estándares se obtiene dividiendo el tiempo de retención entre 2,5.

Tomando en consideración los tiempos de retención de los patrones de AHL obtenidos en HPLC-MS/MS (Tabla 4.2.) y equiparándolos con las fracciones de HPLC obtenidas para los bioensayos en placas microtítulo, se pudo establecer que los picos presentes en las fracciones 7-9, con tiempos de retención en torno a 19 minutos, deben corresponder a la 3-OH-C8-HSL y a la 3-oxo-C8-HSL, aquellos que aparecen entre las fracciones 11-12, con tiempos de retención superiores a los 26 minutos, se deberían a la C8-HSL y por último, los que estaban en las fracciones 15-17, con más de 38 minutos de tiempo de retención, a las C14-HSL y sus derivados oxo- e hidroxi-. La mayoría de estos picos están presentes en las tres estirpes de rizobios. Algunos de los picos, especialmente aquellos presentes en las fracciones 24-25, no se corresponden con ninguna AHL patrón, por lo que a pesar de inducir al biosensor su naturaleza química parece no ser de tipo AHL.

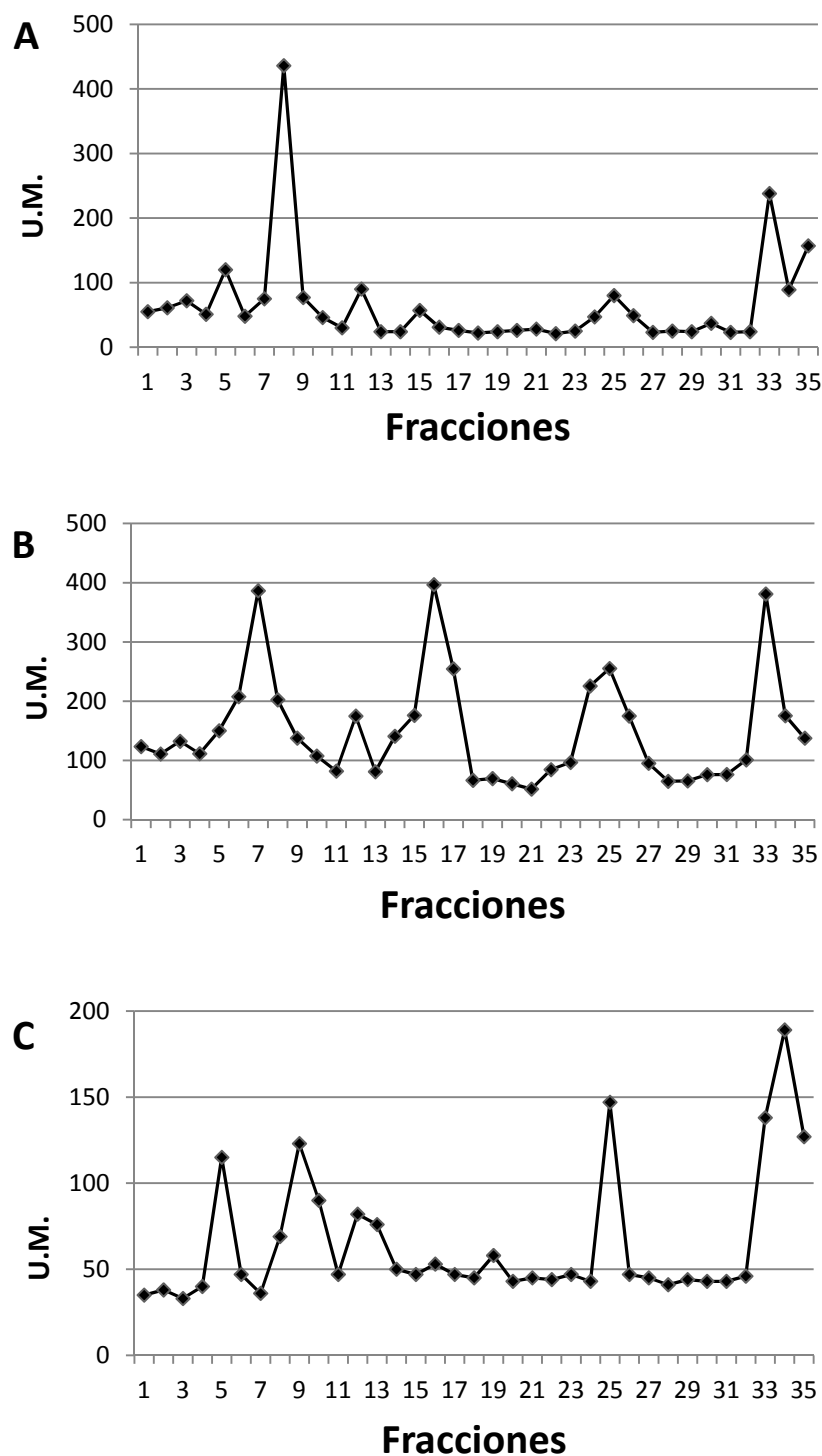


Figura 4.14. Ensayos de actividad β -galactosidasa de fracciones obtenidas por HPLC de extractos de sobrenadantes bacterianos. La inducción del biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) se midió mediante actividad β -galactosidasa (U.M.). Las fracciones obtenidas por HPLC ensayadas provienen de los extractos de sobrenadantes bacterianos de SMH12 (A), ISP42 (B) e IS123 (C).

Todos estos resultados indican que *S. fredii* SMH12 produce al menos la C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL, *R. etli* ISP42 al menos la C8-HSL, la 3-OH-C8-HSL y la 3-oxo-C14-HSL, y *R. sultae* IS123 al menos la C8-HSL, la 3-OH-C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL.

4.1.4.- Detección, aislamiento y secuenciación de genes de síntesis de AI

Ninguno de los genomas de las tres estirpes de rizobios ha sido secuenciado hasta la fecha. Por lo tanto, la búsqueda de genes de síntesis de AI se llevó a cabo mediante amplificación por PCR a partir de cebadores de genes de síntesis de AI de microorganismos relacionados filogenéticamente.

Así pues, se diseñaron cebadores externos de los genes *traI* de *A. tumefaciens* C58 (accession number AF057718), *traI(2)* de *S. fredii* HH103 (secuenciación del genoma en progreso por nuestro grupo de investigación), *rail* y *cinI* de *R. etli* CFN42 (NC_0077661) y *sinI* y *mell* (AL591688) de *S. meliloti* Rm1021 y se llevaron a cabo ensayos de amplificación por PCR usando como molde el ADN genómico de SMH12, ISP42 e IS123 (Los resultados se resumen en la Tabla 4.3.). En SMH12, se detectaron mediante esta técnica el gen *traI* y el gen *traI(2)*, que generaron amplicones de ~1,2 kb y ~1 kb, respectivamente. Estos fragmentos fueron clonados en el vector pMBL-T obteniéndose el plásmido pMU977 en el caso de *traI* y en el vector pGEM-T Easy en el caso de *traI(2)* obteniéndose pMUS1099. En ISP42 fueron los genes *rail* (~1kb) y *cinI* (~1kb) los que se detectaron, aislaron y clonaron en el vector de clonación pMBL-T para obtener los plásmidos pMUS979 y pMUS1033, respectivamente (Tabla 4.3.). Por último, ninguno de los cebadores utilizados permitieron la amplificación por PCR usando como molde el ADN genómico de IS123. Los controles usando ADN genómico de los respectivos organismos de los que provienen los genes dieron resultados positivos.

La secuenciación de los fragmentos de ADN contenidos en los plásmidos pMUS977, pMUS979, pMUS1033 y pMUS1099 indicaron que los 4 amplicones presentaban homología con los genes de los microorganismos de los que se diseñaron los cebadores. La secuenciación de *traI* (FJ515278) de SMH12, *rail* (FJ516401) y *cinI* (FJ516402) de ISP42 nos permitió identificar toda la ORF de cada uno de estos genes. Sin embargo, la

secuenciación del gen *traI(2)* de SMH12 fue de poca calidad (solo 325 nucleótidos del total del amplicón de 1220 pb y no permitió obtener la secuencia completa de la ORF, por lo que únicamente nos sirvió para confirmar la presencia de este gen en *S.fredii* SMH12.

Tabla 4.3. Genes de síntesis de AI detectados por PCR en *S. fredii* SMH12, *R. etli* ISP42 y *R. sultae* IS123.

	<i>traI</i>	<i>traI(2)</i>	<i>raiI</i>	<i>cinI</i>	<i>sinI</i>	<i>mell</i>
SMH12	pMUS977	pMUS1099	-	-	-	-
ISP42	-	-	pMUS979	pMUS1033	-	-
IS123	-	-	-	-	-	-

-: no amplificación por PCR. Las amplificaciones positivas se indican por los nombres de los plásmidos en los que están clonados los genes de síntesis de AI.

La secuenciación del fragmento de ADN del gen *traI* (pMUS977) indicó que tenía un tamaño de 1016 pb y que contenía el gen entre las posiciones 268 y 894. En el caso de *raiI* (pMUS979) el tamaño del amplicón fue de 847 pb estando el gen entre las posiciones 202 y 840. Por último, en el fragmento de ADN de 788 pb que contiene *cinI* (pMUS1033), el gen se encontró entre las posiciones 27 y 692.

Por otra parte, a partir de las secuencias de los genes obtenidos se dedujeron las secuencias de las correspondientes proteínas (Figura 4.15.). La proteína TraI (FJ515278) de *S. fredii* SMH12 posee un 98% y 74% de identidad respecto a las proteínas TraI de *Rhizobium* sp. NGR234 (AAB92427) y *A.tumefaciens* C58 (BAB47268). RaiI (ACL67951) y CinI (ACL67952) de ISP42 fueron un 90% y 98% idénticas, respectivamente, a las proteínas correspondientes de *R. etli* CFN42 (ABC94330 y ABC91684). El alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las tres proteínas de síntesis de AI detectadas mostró una mayor identidad en la zona amino terminal.

Estos resultados indican que *S. fredii* SMH12 contiene en su genoma los genes de síntesis de AHL *traI* y *traI(2)*. *R. etli* ISP42 posee los genes *raiI* y *cinI*.

TraIS	1	MQIIAISKPRNIEEAQLLRSHHQLRARVFS	SDRLGWEVNVVGGCESDTFDDLOPTYILAVS
TraIA	1	MRVIAISSPRNVREAQLLOCHHQLRARVFADRLGWEVDVADGRESDAEDALMPTYILAIS	
RaiII	1	-MRILTKDMLDTRRAFDDEMFRARAVERDRLGWQVDVRDQWERDRYDEAEDPVYLVTH	
RaiIC	1	-MRILTKDMLDTRRAFDDEMFRARAVERDRLGWQVDVRDQWERDRYDEAEDPVYLVTO	
CinII	1	-MFVIIQAHEYQKHAAVLEQMFRRKRVFADQLGWDVPVIGPYERDSYDSLSPAYLVWCN	
CinIC	1	-MFVIIQAHEYQKHAAVLDQMFRLRKRVFADQLGWDVPVIGPYERDSYDALSPAYLVWCN	
consensus	1	miliisk	rea lld mfrlRarVFADrLGWeVdVv gwErDtyDdl p yil q
TraIS	61	-SNDRVVGCARLLPALGPTMVANVFPSLLSAGHLDAHSSMVESSRFCVDITFLAESRGDG-	
TraIA	61	-NRDEWAGCARLLPTLGPTMLADVPSLLPYQLNGHAAMVESSRFCVDITFLAEGRGDG-	
RaiII	60	QPSGTLTGSLRLLPTTGATMLKSEFRHFFDQPIDVDSPTTWECTRFCLHPHAGQMEQS--	
RaiIC	60	RPSGTLTGSLRLLPTTGATMLKSEFRHFFDQPIDVDSPTTWECTRFCLHPHAGHMEQS--	
CinII	60	DSRTFLYGGMRMLPPTTGPTLLYDVFRETFPAAADLVAPGIWEGTRMCIDEEAIARDFPNI	
CinIC	60	DSRTFLYGGMRMLPPTTGPTLLYDVFRETFPAAADLVAPGIWEGTRMCIDEEAIARDFPNI	
consensus	61	sr rl G lRLlPttGpTml dvFr	fpag dv p mwE tRfCvd aa e
TraIS	119	SIHEATLTMFAGIIEWSVANRYTEIVTVTDLRFERILARVGVWPLQRIQEPPIGATVAVA	
TraIA	119	SIHEATLTMFAGIIEWCIATGYTEIVTVTDLRFERILGRVGVWPLHRLQEPKIGVTMAVA	
RaiII	118	--RAVATELLSGLCDLALETGIESIVGVYDVAMIAVYRRSVGDRQRLPDPGRR-SASCMY	
RaiIC	118	--RAVATELLSGLCDLALDTGIESIVGVYDAAMVAVYRRIGWRPMPPLARSRPE-IGKLYV	
CinII	120	DAGRAFSMMLLALCECALDHGHTMISNYEPYLRVYKRACAEVEELGRADGYGKYPVCC	
CinIC	120	DAGRAFSMMLLALCECALDHGHTMISNYEPYLRVYKRACAEVEELGRADGYGKYPVCC	
consensus	121	h a t ml glce aldtgi sivtvtydl m rvyrRvgwdl rlgrrp	g lv
TraIS	179	GTMPAKADTFMRLRPANYRSQIIISTFGQSA-----	
TraIA	179	GTLPAANTETFLRLRPSNYRSELTPISQAA-----	
RaiII	175	GLWM-----	
RaiIC	175	GLWDVTADNCRTLRANLYRLLEQASPNPARAPVNGGMG----	
CinII	180	GAFVSDRVLRKMRAALGLTLPLYVRHVPARSVVTQFLEMAA	
CinIC	180	GAFVSDRVLRKMRAALGLTQPLYVRHVPARSVVTQFLEMAA	
consensus	181	G wdv t d rrlraalyrs i l a v	

Figura 4.15. Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de las proteínas de síntesis de AI. Se muestran las secuencias alineadas de la proteína TraI de *S.fredii* SMH12 y *A.tumefaciens* C58, RaiI de *R.etli* ISP42 y *R.etli* CFN42, y CinI de *R.etli* ISP42 y *R.etli* CFN42. En negro se muestran los residuos idénticos al consenso y en gris los residuos similares.

4.1.5.- Mutación de los genes de síntesis de AI y del gen *nodD1* de *S. fredii* SMH12

Para estudiar el papel de estos genes en la síntesis de AI así como su función en la colonización y en la simbiosis con las leguminosas, se construyeron mutantes en estos genes de síntesis de AI. Además, también se construyó un mutante en el gen *nodD1* de SMH12. Para tal fin, se empleó una estrategia de mutagénesis dirigida que consistió básicamente en:

1. Obtención de un derivado del vector pK18mob (Km^R) que portase un fragmento de ADN que contuviera un determinado gen, o parte de él, interrumpido por un casete que

porta un gen de resistencia a un antibiótico. Este vector se puede transferir a los rizobios por conjugación, pero es suicida en estas bacterias al no poderse replicar.

2. Transferencia por conjugación del plásmido generado a la estirpe de rizobio y posterior selección de transconjugantes sensibles a kanamicina y que posean la resistencia al antibiótico codificada en el casete utilizado para mutagenizar el gen. Para ello, los transconjugantes se seleccionaron primero en un medio de cultivo suplementado con el antibiótico cuya resistencia es codificada por el casete y, posteriormente, se seleccionan aquellos clones sensibles a kanamicina. Estos clones serían aquellos en los que el gen de interés ha sido reemplazado, mediante un evento de doble recombinación (homogenotización), por la versión mutada del gen que portaba el plásmido introducido.

3. Comprobación de la mutación mediante hibridación. Para ello, se hibrida el ADN genómico de los posibles mutantes, digerido con una endonucleasa que no corte dentro del casete empleado o que corte dejando fragmentos de tamaño predecible, con una sonda que reconozca el gen en cuestión. El patrón de hibridación se compara con el que mostraba el ADN genómico de la estirpe parental y se selecciona un candidato en el que el fragmento de ADN que hibrida tiene un tamaño igual a la suma de los tamaños del fragmento que hibrida en la estirpe parental y del casete utilizado en la mutagénesis.

Utilizando esta estrategia se construyeron los dos mutantes en los genes de síntesis de AI: *trai* de SMH12 y *rail* de ISP42 y en otro gen más, *nodD1*, de *S.fredii* SMH12. El gen *cinI* de *R.etli* ISP42 no pudo ser mutado mediante esta estrategia. Para mutagenizar los genes *trai* y *nodD1* se utilizó el casete *lacZ*-Gm^R contenido en el plásmido pAB2001 (Becker *et al.*, 1995). El casete *lacZ*-Gm^R contiene un gen de resistencia a la gentamicina (Gm^R) y el gen *lacZ* carente de promotor; si el casete se inserta dentro de un gen en el sentido de la transcripción de *lacZ*, se pueden realizar estudios de expresión del gen mutado mediante la estimación de la actividad β -galactosidasa. Para mutagenizar el gen *rail* se utilizó el interposón Ω , contenido en el plásmido pHP45 Ω (Prentki y Krisch, 1984) y que codifica resistencia a espectinomicina. Este interposón provoca una interrupción completa de la transcripción del gen donde está inserto al portar secuencias terminadoras de la transcripción. Con ello, se obtendría un fondo genético Spc^R, incapaz de sintetizar la proteína Rail de ISP42.

4.1.5.1.- Mutagénesis dirigida de *traI* de *S. fredii* SMH12

Para la construcción del mutante *traI* se partió del plásmido pMUS977. Un fragmento *EcoRI HindIII* de ~1,2 kb de pMU977 que contenía el gen se subclonó en el vector pK18mob, obteniéndose el plásmido pMUS989. Este plásmido se digirió con la enzima *AleI*, que genera extremos romos y posee un único punto de corte en el inicio del gen *traI*. Por otro lado, el plásmido (pAB2001) que porta el casete *lacZ-Gm^R* se digirió con *SmaI*, que también genera extremos romos y se tomó el fragmento de ~ 4,5 kb para su ligación con el plásmido pMUS989 digerido con *AleI*. De esta forma se obtuvo el plásmido pMUS1009. La mutación se homogenizó transfiriendo por conjugación este plásmido a *S. fredii* SMH12 y se seleccionaron los clones resistentes a gentamicina y sensibles a kanamicina (Figura 4.16.).

La homogenización de la mutación se confirmó mediante hibridación digiriendo el ADN total de *S. fredii* SMH12 y del posible mutante con la enzima *XhoI* (no corta el gen pero sí corta el casete). Se utilizó como sonda de hibridación el producto de PCR de ~1,2 kb amplificado con los cebadores TraI F y TraI R y se incorporaron en la reacción nucleótidos marcados con digoxigenina. De esta forma, se comprobó la mutación y se obtuvo el mutante SVQ646 (=SMH12 *traI::lacZ-Gm^R*) (Figura 4.17.).

Para verificar que el gen *traI* de SMH12 está implicado en la síntesis de AI su mutación *a priori* debe determinar la pérdida de al menos una de las AHL del total que produce la bacteria. Para comprobarlo, se crecieron la estirpe silvestre y el mutante SVQ646 en medio YM(3) durante 6 días. De estos cultivos se tomaron los sobrenadantes y se extrajeron con diclorometano. Tras concentrar las muestras se realizó una TLC y se usó *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) para su revelado. Los resultados mostraron que el perfil de AHL del mutante SVQ646 (=SMH12 *traI::lacZ-Gm^R*) era similar que el de la estirpe silvestre SMH12 (Figura 4.19.). En ambos casos se producían al menos 4 moléculas AI diferentes. La mutación en el gen *traI* de NGR234 tampoco parece afectar a la producción de AI, por lo que los autores proponen la existencia de un segundo gen de síntesis de AI que genera el mismo tipo de AI que el que sintetiza TraI (He *et al.*, 2003).

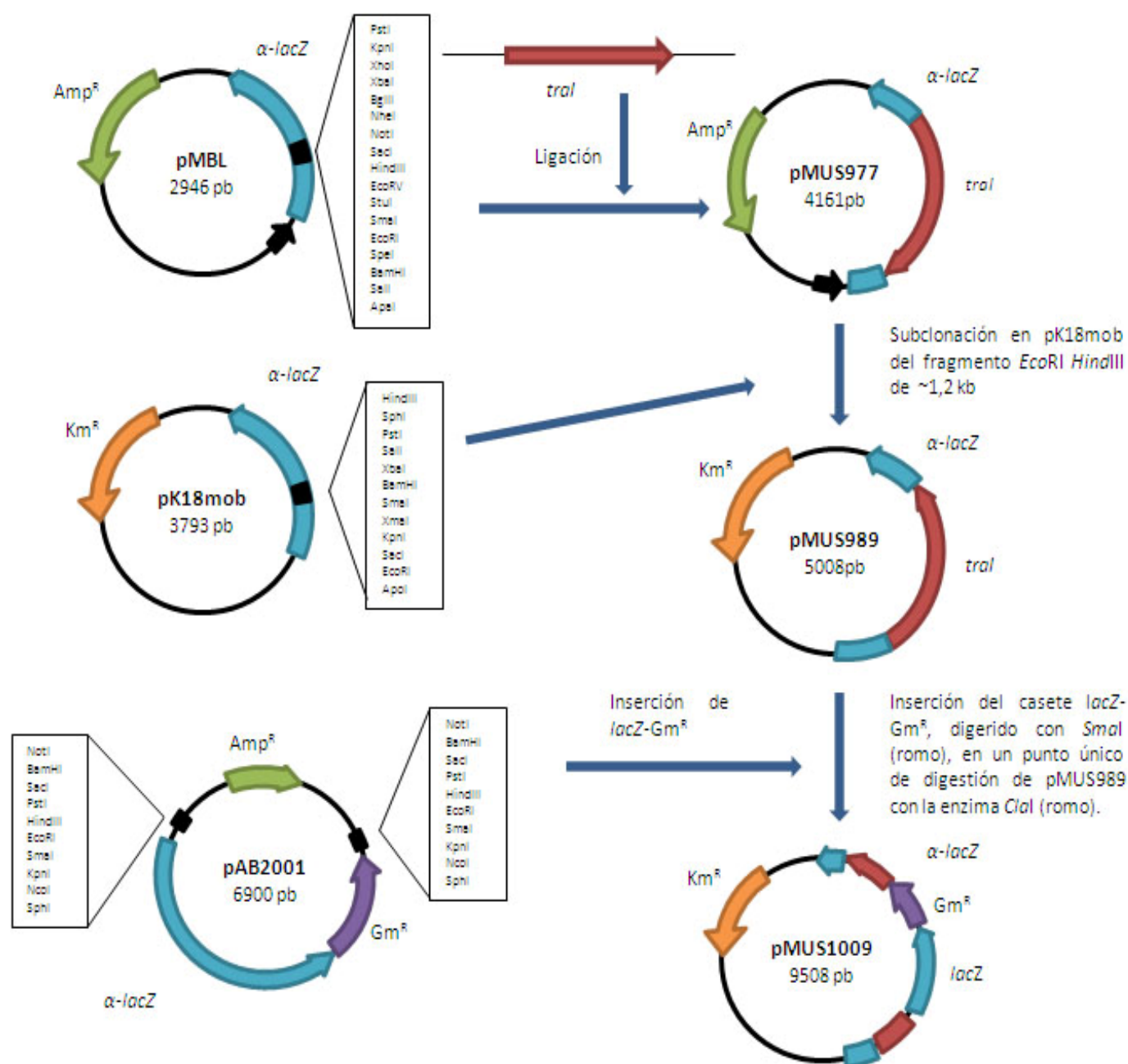


Figura 4.16. Esquema de mutagénesis in vitro del gen *traI* de SMH12. La estrategia de mutación consistió en la construcción de un plásmido suicida en el rizobio que portaba el gen *traI* con la inserción de casete *lacZ*- Gm^R , de tal forma que únicamente mediante recombinación *S.fredii* SMH12 obtiene la resistencia al antibiótico. La doble recombinación se selecciona por sensibilidad a Km .

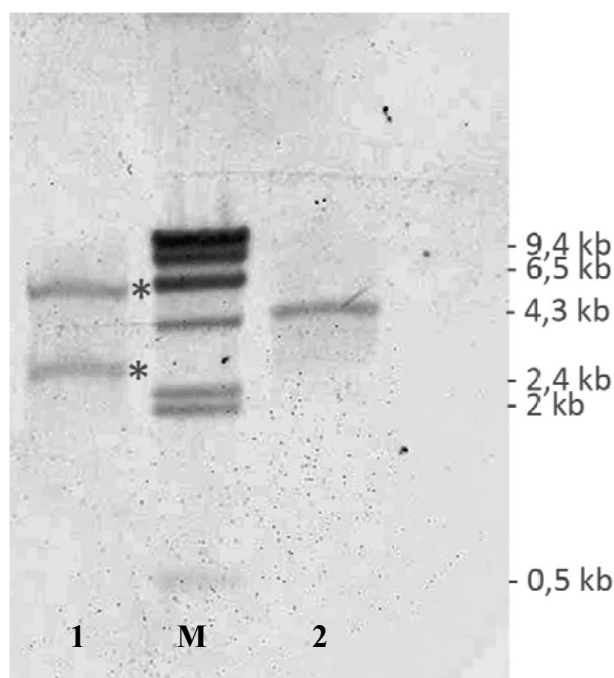


Figura 4.17. Comprobación mediante hibridación de la construcción del mutante *traI* de SMH12 (SVQ646). M: marcador λ *Hind*III Dig. Carril 1: ADN genómico de SVQ646 (= SMH12 *traI::lacZ-Gm^R*). Carril 2: ADN genómico de SMH12. Ambos ADN fueron digeridos con la enzima *Xho*I. Los asteriscos señalan las bandas resultantes de la digestión del fragmento del genoma que lleva el interposón. La suma de los tamaños de las dos bandas resultantes supera en 4,5 kb el tamaño de la banda del silvestre (banda del carril 2). Los tamaños del marcador (kb) se muestran al margen de la figura.

4.1.5.2.- Mutagénesis dirigida de *nodD1* de *S. fredii* SMH12

Para la construcción del mutante *nodD1* se partió del plásmido pMUS534 (Vinardell *et al.* 2004), que es un derivado de pK18mob con un fragmento *Hind*III de ~6 kb que porta la fusión *nodD1::lacZ-Gm^R* construido a partir del gen *nodD1* de HH103, una estirpe de *S. fredii* muy relacionada filogenéticamente con SMH12. La mutación se homogenizó transfiriendo por conjugación este plásmido a *S. fredii* SMH12 y se seleccionaron los clones resistentes a gentamicina y sensibles a kanamicina.

La homogenización de la mutación se confirmó mediante hibridación, digiriendo el ADN genómico de *S. fredii* SMH12 y del posible mutante con la enzima *Sal*I (no corta ni el gen ni el casete), y utilizando como sonda de hibridación el producto de PCR de ~1 kb amplificado con los cebadores NodD1 F y NodD1 R e incorporando en la reacción

nucleótidos marcados con digoxigenina (Figura 4.18.). De esta forma, se obtuvo el mutante SVQ648 (=SMH12 *nodD1::lacZ-Gm^R*).

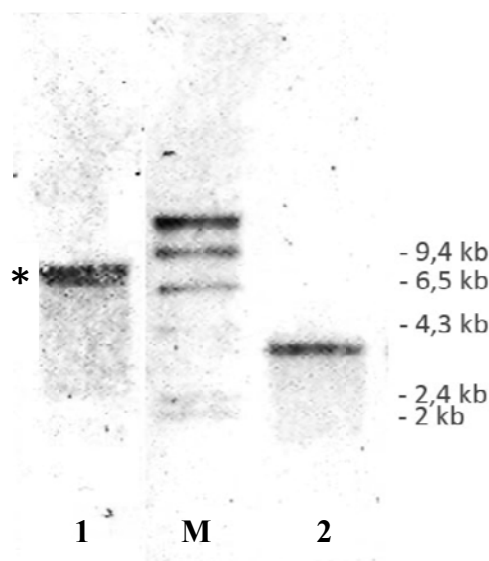


Figura 4.18. Comprobación mediante hibridación de la construcción del mutante *nodD1* de SMH12(SVQ648). M: marcador λ *Hind*III Dig. Carril 1: ADN genómico de SVQ648 (= SMH12 *nodD1::lacZ-Gm^R*). Carril 2: ADN genómico de SMH12. Ambos ADN fueron digeridos con la enzima *Sa*II. El asterisco muestra la banda resultante de la inserción del interposón. El incremento de la banda en el mutante es de 4,5 kb respecto al tamaño de la banda del silvestre (carril 2). Los tamaños del marcador (kb) se muestran en el margen de la figura.

Se estudió la influencia de la mutación en el gen *nodD1*, SVQ648 (=SMH12 *nodD1::lacZ-Gm^R*), en el perfil de AHL mediante TLC y revelado con el biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) como estirpe biosensora. Los resultados mostraron que el perfil de AHL en el mutante SVQ648 era similar al de la estirpe silvestre SMH12 (Figura 4.19.).

4.1.5.3.- Mutagénesis dirigida de *rail* de *R. etli* ISP42

Para la construcción del mutante *rail* de ISP42 se partió del plásmido pBML-T Vector con el fragmento de ADN que contiene el gen *rail* de ISP42 inserto (pMUS979) (Figura 4.20.). Un fragmento *Eco*RI *Hind*III de ~1 kb de pMU979 que contenía el gen se subclonó en el vector pK18mob, obteniéndose el plásmido pMUS994. Este plásmido se digirió con la enzima *Bam*HI, que genera extremos cohesivos y posee un único punto de corte en mitad del gen. Por otro lado, se digirió con *Bam*HI el plásmido pHP45 Ω , y se

tomó el fragmento de 2 kb para su ligación con el plásmido pMUS994 digerido con la misma enzima. De esta forma, se obtuvo el plásmido pMUS996. La mutación se homogenizó transfiriendo por conjugación este plásmido a *R. etli* ISP42 y se seleccionaron los clones resistentes a espectinomicina y sensibles a kanamicina.

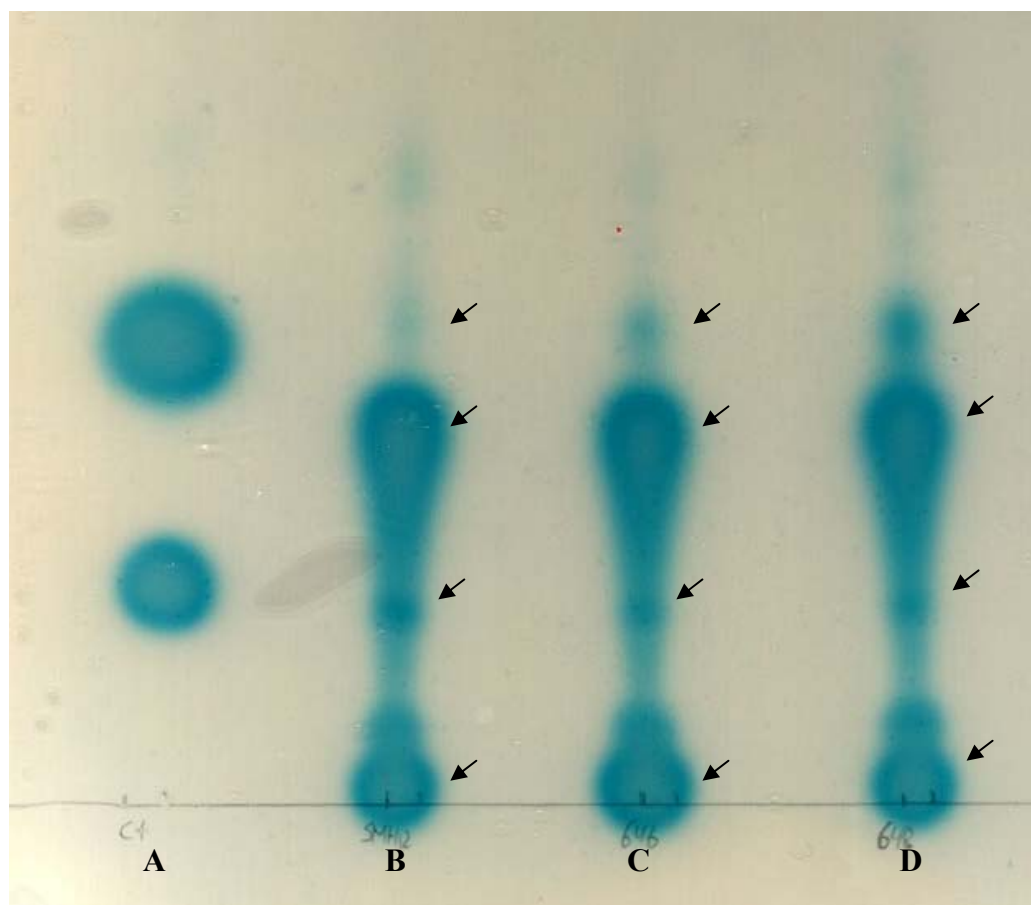


Figura 4.19. Cromatografía en capa fina de los extractos de SMH12 y los mutantes *traI* y *nodD1*. Extractos de sobrenadantes de cultivos bacterianos de SMH12 (B), SVQ646 (C) y SVQ648 (D). Se utilizaron cromatoplasas de fase reversa C_{18} y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles se usaron las AHL comerciales C8-HSL (A inferior) y la C6-HSL (A superior). Con flechas están señaladas las diferentes manchas correspondientes a AI.

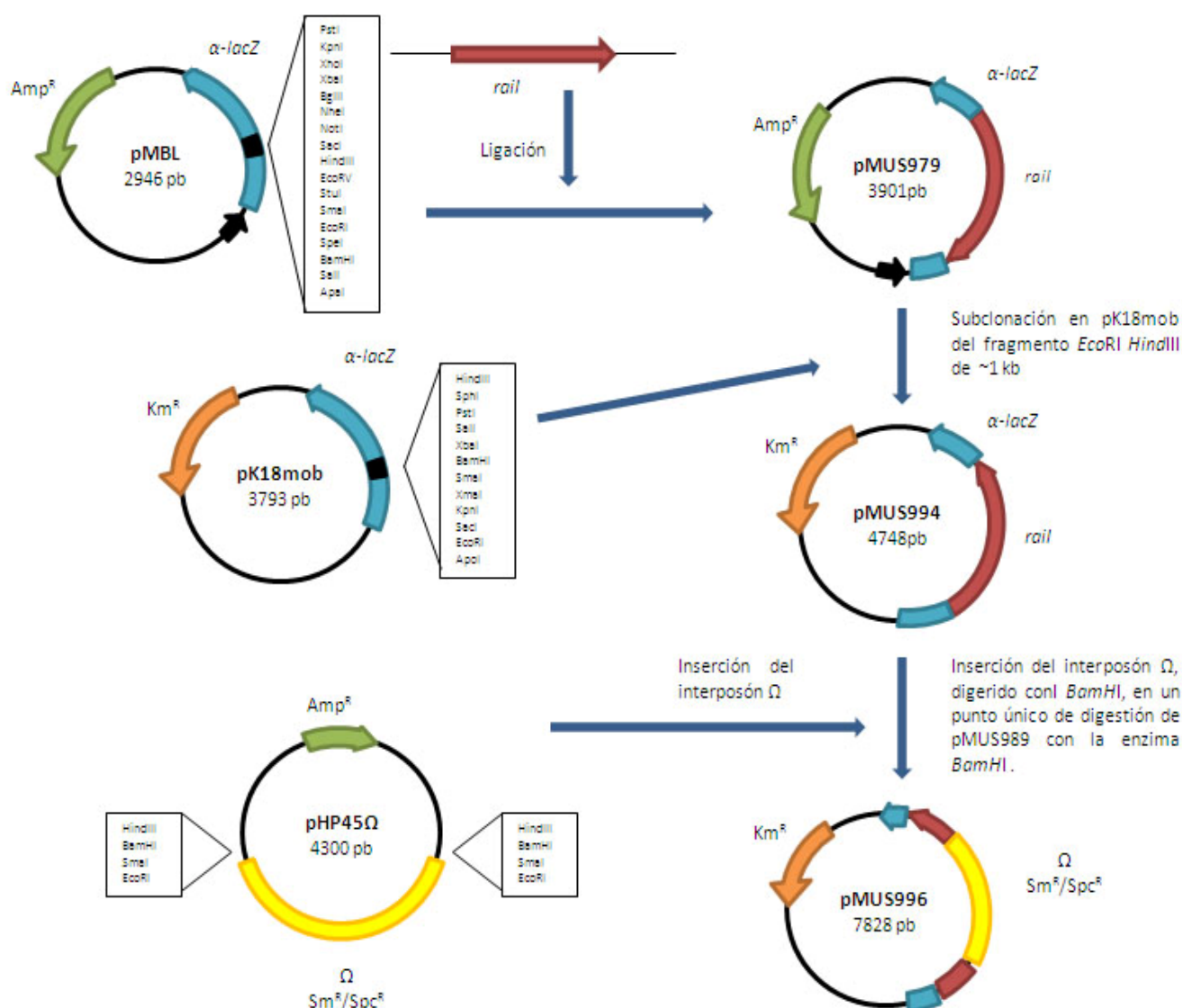


Figura 4.20. Esquema de mutagénesis in vitro del gen *raiI* de ISP42. La estrategia de mutación consistió en la construcción de un plásmido suicida en el rizobio que portaba el gen *raiI* con la inserción del interposón Ω , de tal forma que únicamente mediante recombinación *R. etli* ISP42 obtiene la resistencia al antibiótico. La doble recombinación se selecciona por sensibilidad a Km.

La homogenización de la mutación se confirmó mediante hibridación, digiriendo el ADN genómico de *R. etli* ISP42 y del posible mutante con la enzima *EcoRV* (que no corta el gen ni el casete), y utilizando como sonda de hibridación el producto de PCR de ~1 kb amplificado con los cebadores Railtext F y Railtext R e incorporando en la reacción nucleótidos marcados con digoxigenina (Figura 4.21.). De esta forma, se obtuvo el mutante SVQ664 (=ISP42 *raiI*:: Ω).

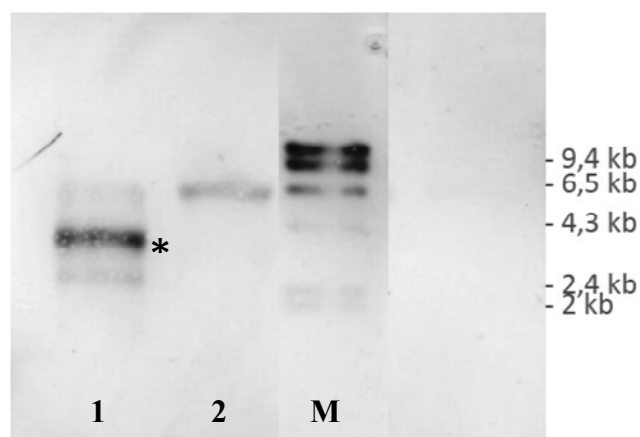


Figura 4.21. Comprobación mediante hibridación de la construcción del mutante *rail* de ISP42 (SVQ664). M: marcador λ *Hind*III Dig. Carril 1: ADN genómico de ISP42. Carril 2: ADN genómico de SVQ664 (= ISP42 *rail*:: Ω). Ambos ADN fueron digeridos con la enzima *Eco*RV. El asterisco muestra la banda resultante de la inserción del interposón. El incremento de la banda en el mutante es de 2 kb respecto a la banda del silvestre (carril 2). Los tamaños del marcador (kb) se muestran en el margen de la figura.

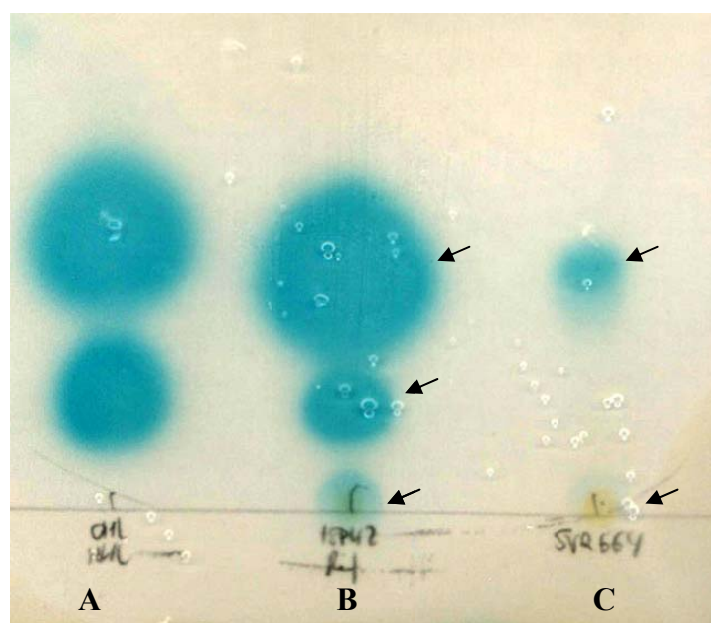


Figura 4.22. Cromatografía en capa fina de los extractos de ISP42 y el mutante *rail*. Se cargaron extractos de sobrenadantes de cultivos bacterianos de ISP42(B) y SVQ664(C). Se utilizaron cromatoplasas de fase reversa C_{18} y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles se usaron las AHL comerciales C8-HSL (A inferior) y la C6-HSL (A superior). Con flechas están señaladas las diferentes manchas correspondientes a AI.

El estudio del perfil de AI producidos por ISP42 y el mutante *rail* (SVQ664) mediante TLC usando al biosensor NT1(pZRL4) indicó que, la estirpe silvestre al

menos produce tres AI diferentes (Figura 4.22.). En la estirpe mutada en el gen de síntesis de AI se observó que uno de los AI que produce la estirpe silvestre dejaba de producirse completamente y los otros dos reducían drásticamente su concentración.

Todos estos resultados nos permiten concluir que mientras las mutaciones en los genes *nodD1* y *traI* de *S. fredii* SMH12 no afectan a la producción de AHL, la mutación en el gen *rail* de *R. etli* ISP42 redujo drásticamente la producción de todas las AHL.

4.1.6.- Obtención de estirpes de rizobios defectivas en la producción de AHL

Ninguna de las tres estirpes en estudio (*S. fredii* SMH12, *R. etli* ISP42 y *R. sultae* IS123) tiene secuenciado el genoma, por lo tanto no podemos conocer ni el número ni la secuencia de los genes de síntesis de AI presente en cada uno de los rizobios. Para conocer el papel de los sistemas de QS bacteriano en diferentes aspectos de la simbiosis con la leguminosa es necesario construir estirpes deficientes en todos estos sistemas sin recurrir a la mutagénesis dirigida. Con este propósito, se construyó una estirpe de *S. fredii* SMH12 con un plásmido que expresa la enzima lactonasa que hidroliza el anillo lactónico de las AHL (pME6863=pME6000::*aiiA*), con lo que se pierde la actividad biológica de todos los AI de tipo AHL producidos por la bacteria portadora del plásmido. La estrategia para la construcción de esta estirpe consistió en transferir mediante conjugación el plásmido pME6863 a SMH12 y después seleccionar los transconjugantes resistentes a tetraciclina.

El estudio del perfil de AI producidos por la estirpe SMH12 (pME6863) respecto a la estirpe silvestre indicó un descenso drástico en la cantidad y el número de AHL con actividad biológica (capaces de inducir al biosensor) en presencia de la enzima lactonasa (Figura 4.23.). Por ello, esta estirpe fue utilizada en posteriores experimentos para estudiar el papel de los sistemas de QS en diferentes aspectos de la simbiosis entre *S. fredii* SMH12.

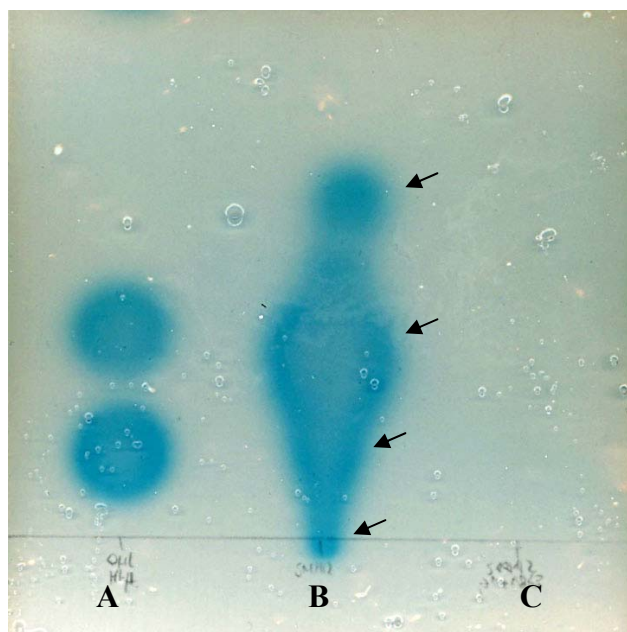


Figura 4.23. Cromatografía en capa fina de los extractos de SMH12 y SMH12 (pME6863). Extractos de sobrenadantes de cultivos bacterianos de SMH12 (B) y SMH12 (pME6863) (C). Se utilizaron cromatoplasmas de fase reversa C_{18} y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles se usaron las AHL comerciales C8-HSL (A inferior) y la C6-HSL (A superior). Las flechas indican las manchas correspondientes a diferentes AI.

De la misma manera, también se introdujo el plásmido que expresa la enzima lactonasa (pME6863=pME6000::*aiiA*) en la estirpe *R.etli* ISP42. La estrategia seguida fue la misma que en SMH12, mediante transferencia de pME6863 por conjugación y selección los transconjugantes resistentes a tetraciclina.

Al igual que en el caso de SMH12 (pME6863), el estudio del perfil de AI producidos por ISP42 (pME6863) respecto a la estirpe silvestre indicó un claro descenso en la cantidad y el número de AHL con actividad biológica (capaces de inducir al biosensor) en presencia de la enzima lactonasa (Figura 4.24.). Por ello, esta estirpe fue utilizada en posteriores experimentos para estudiar el papel de los sistemas de QS en diferentes aspectos de la simbiosis de *R.etli* ISP42.

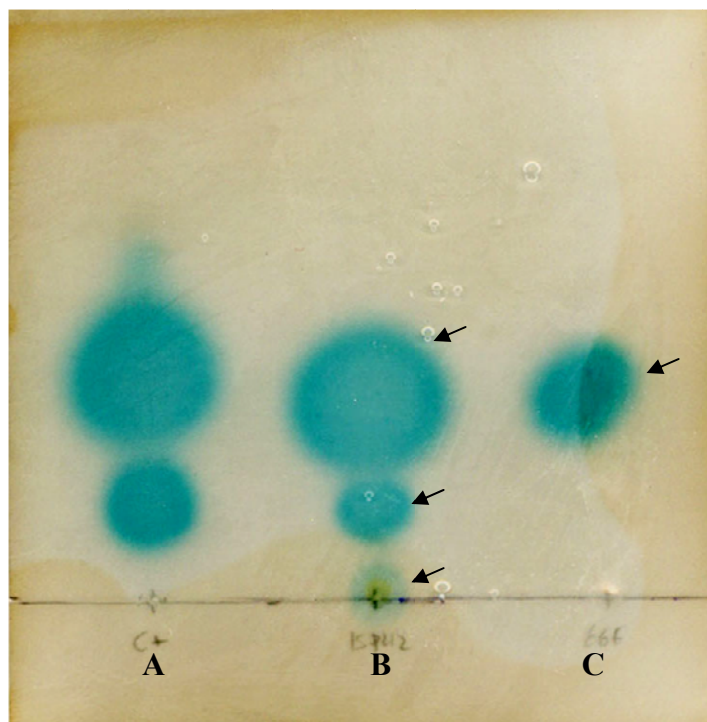


Figura 4.24. Cromatografía en capa fina de los extractos de ISP42 e ISP42 (pME6863). Extractos de sobrenadantes de cultivos bacterianos de ISP42 (B) y ISP42 (pME6863) (C). Se utilizaron cromatoplasacas de fase reversa C₁₈ y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles se usaron las AHL comerciales C8-HSL (A inferior) y la C6-HSL (A superior). Con flechas están señaladas las diferentes manchas correspondientes a AI.

La expresión constitutiva de la enzima lactonasa en *S. fredii* SMH12 y en *R. etli* ISP42 determinó la pérdida casi completa de las distintas AHL producidas por estas estirpes.

4.1.7.- Determinación del AI sintetizado por cada gen de síntesis de AHL

Generalmente, la mutación de los genes de síntesis de AI nos permite conocer en la síntesis de qué AI está implicado este gen, así como llevar a cabo diferentes pruebas para definir el papel de este sistema de QS en un proceso determinado. Sin embargo, en el caso de *S. fredii* SMH12 es posible que exista al menos un segundo gen homólogo a *traI* dado que su mutación no provocó la ausencia de ninguna AHL. Este gen estaría implicado en la síntesis del mismo o los mismos AI, por lo que enmascararía la ausencia

de la AHL sintetizada por *traI*. Por este motivo y con el fin de identificar el AI sintetizado por el gen *traI* se construyeron plásmidos de expresión de los genes de síntesis de AI detectados y secuenciados en SMH12 (*traI*) y en ISP42 (*rail* y *cinI*), y se introdujeron por transformación en *E. coli* DH5 α para, acto seguido, estudiar la producción de AI.

El método consistió básicamente en clonar en el plásmido de expresión pBBR-MCS-5 los diferentes genes de síntesis de AI orientados en el mismo sentido de la transcripción del gen en el que se localiza *lacZ*. En el caso del gen *traI* de SMH12, se digirió el plásmido pMUS977 con las enzimas *EcoRI XhoI*, generando un fragmento de ~1,2 kb que se ligó al citado plásmido de expresión. Mediante cortes enzimáticos, se determinó la correcta orientación del gen. A este plásmido se le denominó pMUS1064 (Figura 4.25.).

En el caso del gen *rail* de ISP42, se partió del plásmido pMUS979, que fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI SacI*, generándose un fragmento de ~1 kb, que fue ligado a pBBR-MCS-5 y, tras comprobar la correcta orientación, se obtuvo el plásmido pMUS1071. Por último, en el caso de *cinI* de ISP42, se partió de pMUS1033, que tras digerirse con *EcoRI HindIII* originó un fragmento de ~1 kb, que fue ligado con el vector de expresión (en la orientación correcta) para originar el plásmido pMUS1063 (Figura 4.25.).

Para conocer qué AI produce cada gen de síntesis, se cultivaron las tres estirpes *E.coli* DH5 α con los plásmidos pMUS1063, pMUS1064 y pMUS1071 y se procedió a extraer los AI y analizar mediante TLC y el biosensor NT1(pZRL4) la presencia de este tipo de moléculas. Los resultados mostraron que el gen *traI* de SMH12 produce una molécula AI con movilidad intermedia entre los patrones C8-HSL y C6-HSL, similar a la de los derivados hidroxí u oxo de la C8-HSL (Figura 4.26.C).

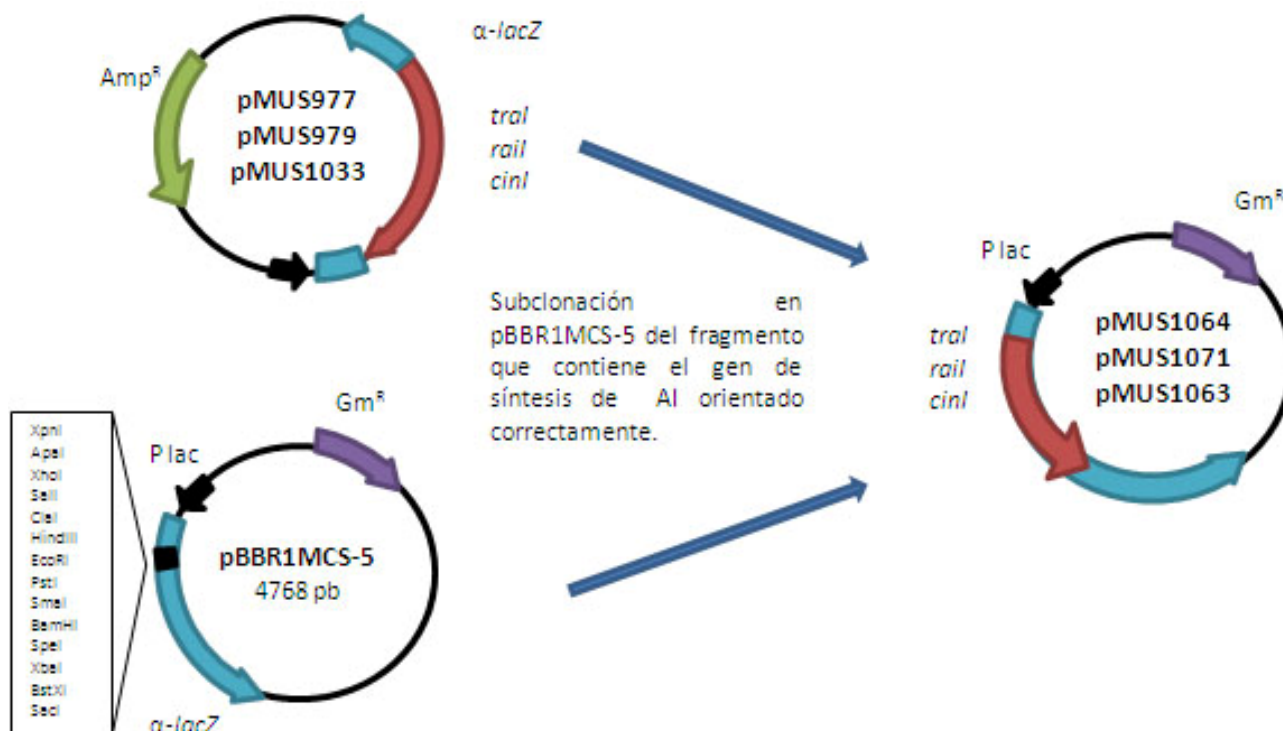


Figura 4.25. Esquema de la construcción de plásmidos de expresión de los genes de síntesis de AI. La estrategia consistió en la subclonación del fragmento de ADN procedente del vector que contenía los genes *traI* de SMH12, *rail* o *cinI* de ISP42 en el vector de expresión *pBBR1MCS-5*, bajo el control del promotor del gen *lacZ*.

Al igual que en *traI*, la expresión del gen *rail* de ISP42 reveló en placas TLC la presencia de una molécula AI con movilidad intermedia entre los patrones C8-HSL y C6-HSL, similar a la de los derivados hidroxilo u oxo de la C8-HSL (Figura 4.26.F). Por último, la expresión del gen *cinI* de ISP42, no mostró la presencia de ningún AI en los ensayos de TLC y revelado con biosensor (Figura 4.26.).

Todos estos resultados nos indican que los genes *traI* de SMH12 y *rail* de ISP42 son los responsables de la síntesis de moléculas con movilidad similar a las AHL de tipo oxo o hidroxilo derivadas de C8-HSL. No se detectó la molécula producida por el gen *cinI*.

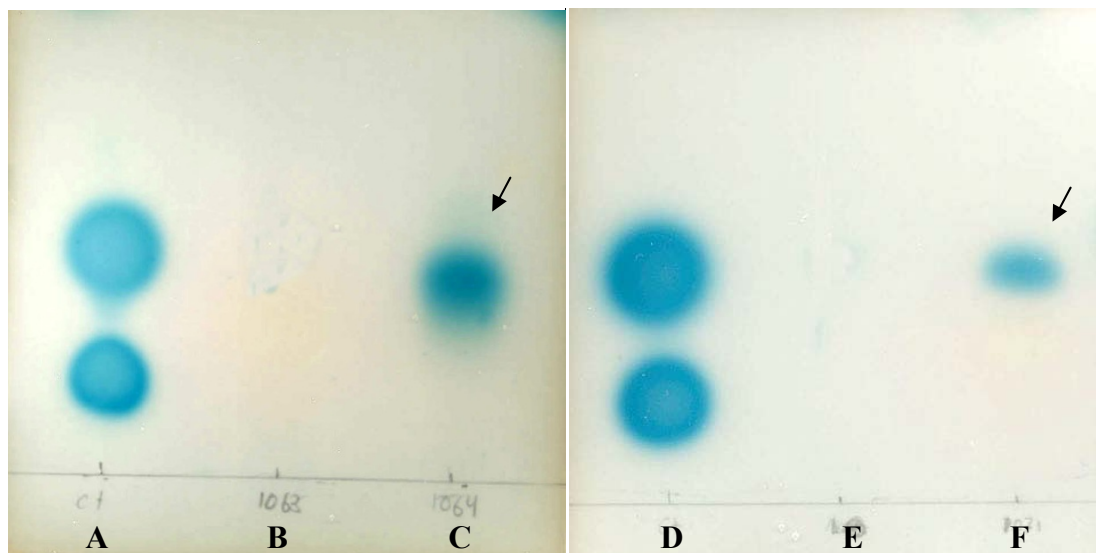


Figura 4.26. Cromatografía en capa fina de los extractos de estirpes que expresan los genes de síntesis de AI. Extractos de sobrenadantes de cultivos bacterianos de *E.coli* DH5 α con los plásmidos pMUS1063 (*cinI*) (B), pMUS1064 (*traI*) (C) y pMUS1071 (*rail*) (F). Se utilizaron cromatoplasas de fase reversa C₁₈ y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles se usaron las AHL comerciales C8-HSL (A/D inferior) y la C6-HSL (A/D superior). Control negativo: medio de cultivo LB (E). Con flechas están señaladas las diferentes manchas correspondientes a AI.

4.2.- Influencia de los flavonoides en la producción global de AI y en la expresión de genes de síntesis de AI

En esta segunda parte, se abordó el estudio de la posible influencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación sobre los genes de síntesis de AI. Para ello, una vez seleccionados los mejores flavonoides inductores de los genes de nodulación en cada una de las estirpes estudiadas se cuantificó la producción total de AI, así como la expresión de los genes de síntesis de AHL anteriormente detectados.

4.2.1.- Efecto de distintos flavonoides sobre la expresión los genes de nodulación

Para determinar qué flavonoides inducían más eficazmente la transcripción del gen *nodA*, se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa utilizando las tres estirpes en estudio en las que previamente se introdujo por conjugación el plásmido pMP240. Este plásmido tiene clonado el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* biovariedad *viceae* fusionado al gen *lacZ* sin promotor, de tal forma que, en presencia de diferentes flavonoides, es el fondo genético en el que se encuentre este plásmido lo que determina la actividad β -galactosidasa.

Los flavonoides ensayados fueron apigenina, daidzeína, 7,4'-dihidroxiavona, genisteína, isoliquiritigenina, morina, naringenina, quercitina y umbeliferona. Los resultados (Tabla 4.4. y Figura 4.27) mostraron que los mejores flavonoides inductores son apigenina y genisteína para SMH12 (en torno a 7 veces más que sin flavonoides), apigenina y 7,4'-dihidroxiavona en el caso de ISP42 (en torno a 5 veces más), y por último, para IS123, daizeína y genisteína (en torno a 7 veces más que sin flavonoides). Así pues, para experimentos posteriores se eligieron como flavonoides inductores genisteína o daidzeína para SMH12, apigenina para ISP42 y daidzeína para IS123. Por otro lado, los flavonoides que determinan menor actividad fueron la umbeliferona para SMH12 y ISP42, y la apigenina en el caso de IS123. Estos flavonoides fueron seleccionados como no inductores en posteriores experimentos.

Tabla 4.4. Expresión del gen *nodA* en presencia de diferentes flavonoides en las tres estirpes estudiadas.

	<i>S. fredii</i> SMH12	<i>R. etli</i> ISP42	<i>R. sllae</i> IS123
Sin flavonoides	1,0 ± 0	1,0 ± 0	1,0 ± 0
Apigenina	7,9 ± 0,59	4,68 ± 1,05 ^a	1,1 ± 0,03 ^b
Daidzeina	6,81 ± 0,52	1,37 ± 0,45	7,82 ± 0,75 ^a
7, 4'-dihidroxiavona	5,84 ± 0,5	5,63 ± 1,21	1,24 ± 0,05
Genisteina	7,2 ± 0,69 ^a	1,31 ± 0,23	6,12 ± 0,18
Isoliquiritigenina	6,0 ± 0,11	4,29 ± 0,84	1,25 ± 0,08
Morina	5,11 ± 1,65	1,27 ± 0,24	1,06 ± 0,04
Naringenin	6,18 ± 0,13	4,39 ± 0,11	0,9 ± 0,05
Quercetina	1,77 ± 0,14	1,04 ± 0,1	0,94 ± 0,06
Umbeliferona	1,02 ± 0,4 ^b	0,86 ± 0,18 ^b	1,94 ± 0,06

Los valores representan la media (± desviación típica) del número de veces que inducen los diferentes flavonoides respecto al control sin flavonoide. Todas las estirpes portan el plásmido pMP240, que posee el promotor del gen *nodA* fusionado a *lacZ*.

a: Flavonoides inductores seleccionados para cada estirpe, y **b:** flavonoides no inductores seleccionados para cada estirpe.

Los resultados corresponden a tres experimentos independientes por triplicado.

Estos resultados nos permitieron seleccionar como flavonoides inductores de los genes de nodulación a la genisteína en SMH12, a la apigenina en ISP42 y a la daidzeína en IS123. Como flavonoides no inductores se eligieron a la umbeliferona en SMH12 y ISP42 y a la apigenina en IS123.

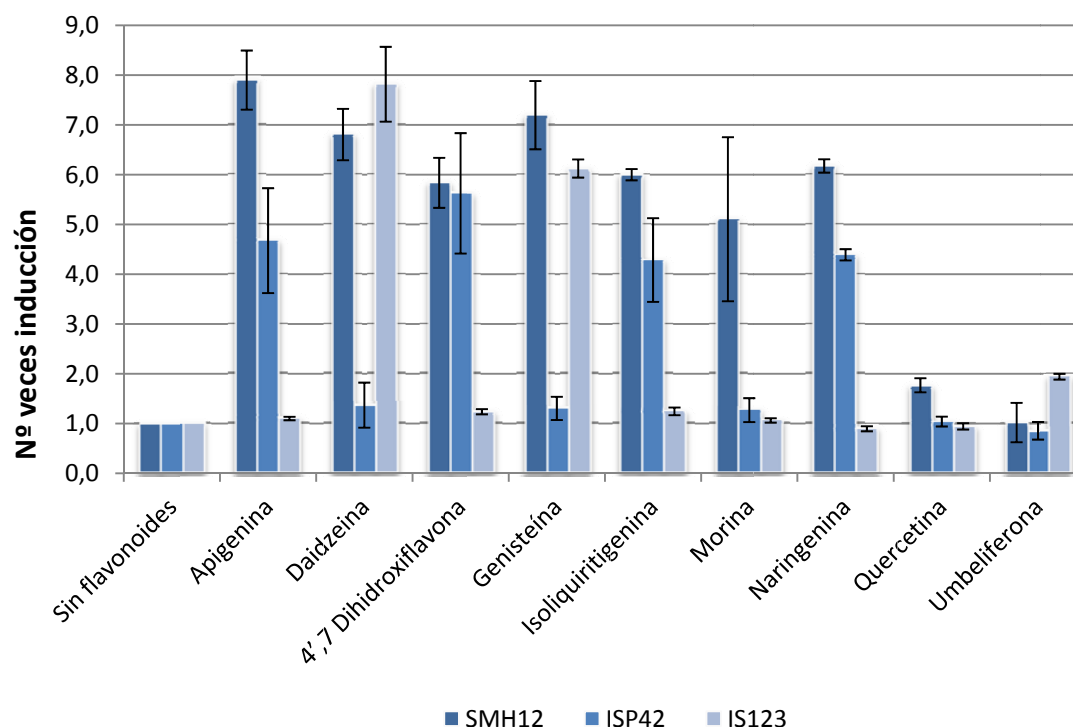


Figura 4.27. Expresión del gen *nodA* en las estirpes *S. fredii* SMH12, *R. etli* ISP42 y *R. sultae* IS123 en presencia de diferentes flavonoides. En las tres estirpes en estudio se introdujo el plásmido pMP240 (que porta la construcción génica *PnodA::lacZ*) y se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa en presencia de los diferentes flavonoides. Los valores representan la media del número de veces que inducen los diferentes flavonoides respecto al control sin flavonoide.

4.2.2.- Influencia de flavonoides en la producción de AI

4.2.2.1.- Ensayos de difusión en placa

Una vez que se seleccionaron los flavonoides inductores y no inductores de los genes de nodulación para cada una de las 3 estirpes, se estudió la influencia de estos flavonoides en la producción total de AI. En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de difusión en placas de Petri usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) con sobrenadantes bacterianos crecidos sin flavonoides, con flavonoides no inductores y con flavonoides inductores. Los resultados mostraron (Figura 4.28.) que SMH12 es el que produce un halo de mayor diámetro del halo, seguido de ISP42 y, por último, IS123. Esto puede ser indicativo de una mayor producción de AI por SMH12, pero hay que tener en cuenta que la afinidad del biosensor por los diferentes AI (generalmente AHL) puede variar. En ningún caso se apreciaron diferencias apreciables en la producción de

AI en presencia de flavonoides no inductores o inductores respecto a las estirpes crecidas sin flavonoides.

Sin embargo, mediante ensayos con diferentes concentraciones de AHL patrones (1x, 1,2x y 5x) se determinó que en este tipo de ensayos, para apreciar diferencias significativas en el diámetro del halo, son necesarias diferencias de concentración de AI superiores a 5 veces (Figura 4.29.).

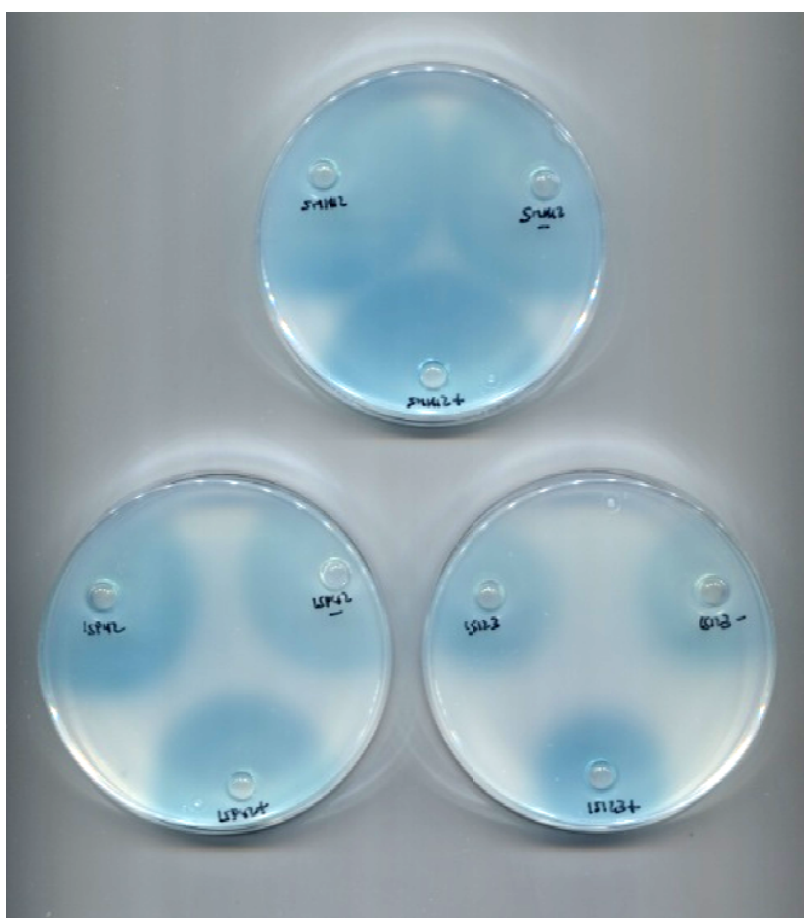


Figura 4.28. Ensayos de difusión en placas de Petri usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) para el estudio de la influencia de los flavonoides sobre la producción de AI. Cada placa de Petri contiene sobrenadantes de las estirpes crecidas sin flavonoides (SMH12, ISP42, IS123), con flavonoides no inductores de los genes de nodulación (SMH12-, ISP42-, IS123-) y con flavonoides inductores de los genes de nodulación (SMH12+, ISP42+, IS123+).

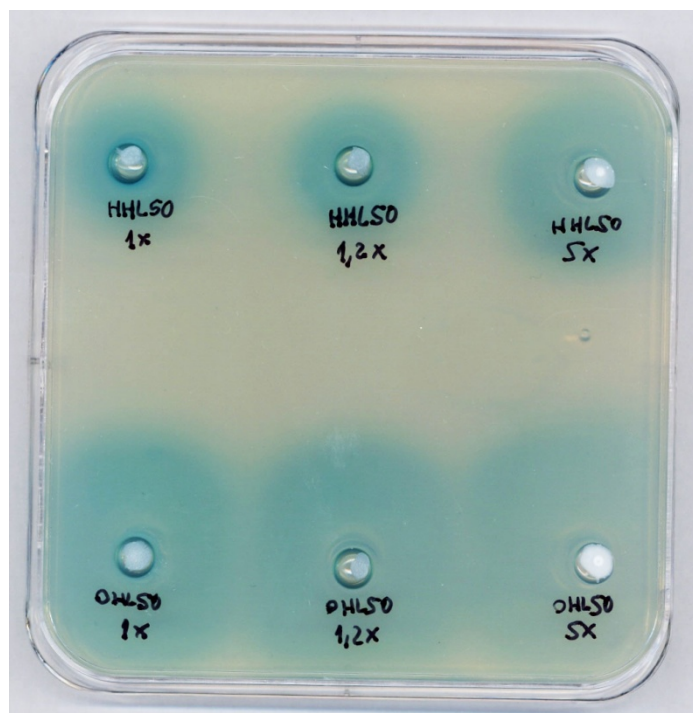


Figura 4.29. Ensayos de difusión en placas de Petri con AHL patrones usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4). En cada pocillo de la placa se añadieron diferentes cantidades [5 μ l (1x), 6 μ l (1,2x) y 25 μ l (5x)] de las AHL patrones C6-HSL (50 μ g/ml) y C8-HSL (50 μ g/ml).

4.2.2.2.- Ensayos de actividad β -galactosidasa del biosensor NT1 (pZRL4) inducido con sobrenadantes bacterianos obtenidos en presencia y ausencia de flavonoides.

Los ensayos de difusión en placa realizados previamente no mostraron diferencias en la producción de AI en las bacterias en estudio en presencia de flavonoides inductores y no inductores de los genes de nodulación. Sin embargo, la no observación de diferencias puede deberse al límite de detección del método, por lo que se desarrolló un método de cuantificación de la producción de AI basado en la actividad β -galactosidasa en cultivo líquido del biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4).

El método consistió en añadir sobrenadantes de las bacterias crecidas en presencia/ausencia de los diferentes flavonoides a las concentraciones finales de 20%, 10%, 5% y 1% a cultivos en fase logarítmica del biosensor. Previamente, se halló el porcentaje óptimo de sobrenadante para apreciar las diferencias en los sobrenadantes obtenidos en las diferentes condiciones para cada bacteria. Fueron elegidas

concentraciones finales del 5 % en el caso de ISP42 y IS123, y del 1% en el caso de SMH12, dado que al producir una mayor cantidad de AI el sobrenadante saturó al biosensor a una concentración del 5 % (datos no mostrados). Tras un periodo de 12 horas de crecimiento del biosensor en presencia de los sobrenadantes bacterianos, se procedió a la determinación de la actividad β -galactosidasa.

Los valores de actividad β -galactosidasa obtenidos se muestran en la Tabla 4.5. Como se observa en la Tabla, todos los sobrenadantes obtenidos indujeron al biosensor a niveles correspondientes a una concentración de 5,5 μ M del estándar 3-oxo-C6-HSL. Además, los sobrenadantes de SMH12, ISP42 y IS123 obtenidos en presencia de los correspondientes flavonoides inductores genisteína, apigenina y daidzeína provocaron un incremento significativo ($\alpha = 10\%$) en la actividad β -galactosidasa del biosensor respecto a la actividad registrada en presencia de sobrenadantes bacterianos obtenidos sin flavonoides. El incremento de la actividad del biosensor NT1 (pZRL4) con los sobrenadantes de los cultivos de las tres estirpes en presencia de sus flavonoides inductores no fue debida a un efecto directo de esos flavonoides sobre la actividad β -galactosidasa del biosensor, dado que los valores de estos últimos rondaron el valor de actividad β -galactosidasa obtenido por el medio del cultivo YM(3). Sin embargo, en las tres estirpes bacterianas, los sobrenadantes obtenidos en presencia de flavonoides no inductores de los genes de nodulación no determinaron un incremento significativo en la actividad β -galactosidasa del biosensor, llegando incluso a disminuir significativamente en el caso de IS123 con la apigenina. La presencia de los diferentes flavonoides ensayados no indujo *per se* un incremento en la actividad β -galactosidasa del biosensor (Tabla 4.5.).

4.2.2.3.- Análisis mediante TLC de los AI producidos por las estirpes en presencia y ausencia de los flavonoides inductores de los genes de nodulación

Una vez detectadas diferencias en cultivos crecidos en presencia de flavonoides inductores de los genes *nod*, se estudió si estas diferencias se debían a que se generaban nuevos AI o a que se incrementaban las cantidades de los que previamente se habían detectado en los cultivos bacterianos sin flavonoides. Para ello, los sobrenadantes de las bacterias crecidas con o sin los flavonoides seleccionados anteriormente, se extrajeron,

concentraron, cargaron en cromatoplasmas de TLC y se revelaron con el biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) tal y como se explica en Materiales y Métodos.

Tabla 4.5. Actividad β -galactosidasa obtenida con el biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZLR4) crecido en presencia de diferentes sobrenadantes bacterianos.

	Unidades Miller	n (%)
Control (YM)	55,7 \pm 16,6	
3-oxo-C6-HSL (5,5 μ M)	351,4 \pm 46,1	
Apigenina (6,2 μ M)	61,3 \pm 10,3	
Genisteína (3,7 μ M)	61,1 \pm 12,8	
Daidzeína (3,9 μ M)	70,1 \pm 6,3	
Umbeliferona (6,2 μ M)	60,6 \pm 2,5	
SMH12	282,3 \pm 2,1	100
SMH12 + umbeliferona (6,2 μ M)	318,2 \pm 8,4	113
SMH12 + genisteína (3,7 μ M)	370,8 \pm 10,3	131 ^a
ISP42	337,1 \pm 23,2	100
ISP42 + umbeliferona (6,2 μ M)	361,3 \pm 3,4	107
ISP42 + apigenina (6,2 μ M)	398,4 \pm 15,7	119 ^a
IS123	322,4 \pm 3,2	100
IS123 + apigenina (6,2 μ M)	297,3 \pm 12	92 ^a
IS123 + daidzeína (3,9 μ M)	421,4 \pm 4,9	130 ^a

Los datos representados son la media \pm desviación típica de al menos 5 experimentos independientes llevados a cabo en triplicado.

El porcentaje de sobrenadante añadido de los diferentes cultivos de SMH12 es de 1%. En el caso de ISP42 y IS123 el porcentaje es de 5%.

n: Porcentaje de inducción de los sobrenadantes bacterianos obtenidos en presencia de flavonoides, respecto al control sin flavonoides (definido como 100%).

Cada actividad β -galactosidasa obtenida en los ensayos con sobrenadantes de bacterias crecidas en presencia de flavonoides fue comparada individualmente con aquella obtenida en los ensayos con sobrenadantes sin flavonoides mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney. Los números seguidos de la letra **a** indican diferencias significativas con un nivel de significación $\alpha = 10\%$.

Los resultados (Figura 4.30.) indicaron que en ninguna de las 3 estirpes estudiadas, la presencia de flavonoides, inductores o no de los genes *nod*, dio lugar a la síntesis de nuevas AHL o incrementó la concentración de las que ya estaban presentes (Figura 4.30.A, 4.30.B y 4.30.C). Las diferencias apreciadas mediante actividad β -galactosidasa (apartado anterior) en cultivos bacterianos crecidos en presencia de flavonoides inductores fue del 120 y 130% (1,2-1,3 veces) respecto a los cultivos sin flavonoides (100%) en las tres estirpes en estudio. Para determinar qué incrementos de concentración de AHL patrones eran necesarios para observar cambios en el diámetro de las manchas detectadas mediante TLC, se cargaron en las cromatoplasas incrementos del 120 % (1,2 veces) y 500 % (5 veces) de los patrones C6-HSL y C8-HSL. Se determinó, que para que se aprecien diferencias en el diámetro de las manchas generadas por AHL patrones, son necesarias diferencias de concentración superiores a 500% (5 veces), por lo que los incrementos del 120% (1,2 veces) detectados previamente mediante actividad β -galactosidasa en medio líquido con el biosensor no son detectables mediante TLC (Figura 4.30.D).

4.2.2.4.- Ensayos de actividad β -galactosidasa de las fracciones obtenidas por HPLC

Puesto que los análisis mediante TLC no permitieron detectar las diferencias de producción previamente detectadas mediante actividad β -galactosidasa en medio líquido con NT1 (pZRL4), se llevaron a cabo ensayos de actividad β -galactosidasa en placa microtítulo de las fracciones obtenidas por HPLC a partir de extractos de sobrenadantes usando al biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4). Para cada estirpe, se realizó el ensayo a partir de cultivos de bacterias crecidas sin o con flavonoides inductores de los genes *nod*. Los resultados mostraron que en *S. fredii* SMH12 (Figura 4.31.A), las fracciones 5, 7-9, 12, 14-15, 17 y 22-25 procedentes de los sobrenadantes con genisteína mostraron niveles más altos de inducción que las provenientes de sobrenadantes de cultivos sin flavonoides. En el caso de *R. etli* ISP42 (Figura 4.31.B), el incremento de inducción en presencia de apigenina se apreció claramente en las fracciones 7-8, 11-12, 14-16 y 24 frente a las fracciones de los cultivos sin inducir. Por último, en *R. sultae* IS123 (Figura 4.31.C), el incremento de inducción en presencia de

daidzeína se detectó en las fracciones 8-9, 12, 16 y 24-25 frente a las correspondientes fracciones de los cultivos sin inducir.

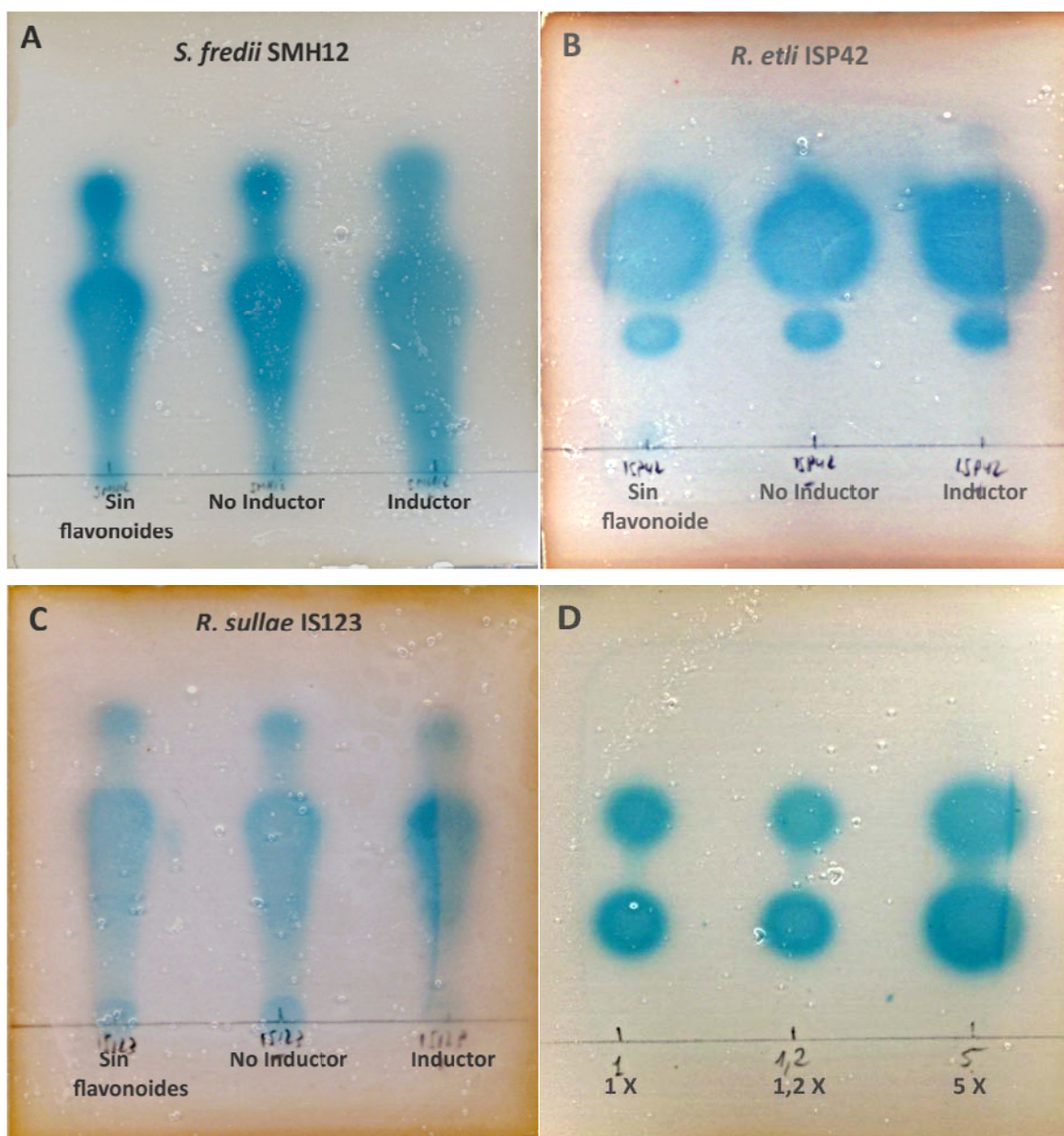


Figura 4.30. Separación y revelado mediante TLC de AI de cultivos de las estirpes crecidas con o sin flavonoides. Se cargaron extractos de sobrenadantes de cultivos bacterianos crecidos con flavonoides no inductores, con flavonoides inductores o sin flavonoides de SMH12 (A), ISP42 (B) y IS123 (C). Se utilizaron cromatoplasmas de fase reversa C_{18} y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles (D) se usaron las AHL comerciales C8-HSL (inferior) y C6-HSL (superior). Como estirpe biosensora se utilizó *A. tumefaciens* NT1(pZRL4)

Tomando en consideración los tiempos de retención de los patrones de AHL usados en HPLC-MS/MS (Tabla 4.6.) y equiparándolos con las fracciones de HPLC obtenidas para los bioensayos en placas microtítulos, se pudo establecer que los picos presentes en las fracciones 7-9, con tiempos de retención de aproximadamente 19 minutos, deben corresponder a la 3-OH-C8-HSL y a la 3-oxo-C8-HSL, aquellos que aparecen entre las fracciones 11-12, con tiempos de retención en torno a los 26 minutos, se correspondería con la C8-HSL, y por último, los que estaban en las fracciones 15-17 a las C14-HSL y sus derivados oxo- e hidrox-, que poseen tiempos de retención superiores a los 38 minutos. La mayoría de estos picos están presentes en las tres estirpes de rizobios. Algunos de los picos, especialmente aquellos presentes en las fracciones 24-25, no se corresponden con ninguna AHL patrón, por lo que a pesar de inducir al biosensor su naturaleza química parece no ser de tipo AHL.

Tabla 4.6. Tiempos de retención y fracción aproximada de las diferentes AHL patrones tras su separación por HPLC.

AHL	tr (min)	Fracción aprox.
C4-HSL (<i>N</i> -butanoil-homoserina lactona)	9,2	3-4
C6-HSL (<i>N</i> -hexanoil-homoserina lactona)	16,8	6-7
3-oxo-C6-HSL (<i>N</i> -(3-oxo-hexanoil)-homoserina lactona)	9,7	3-5
C8-HSL (<i>N</i> -octanoil-homoserina lactona)	26,6	11-12
3-OH-C8-HSL (<i>N</i> -(3-hidroxi-octanoil)-homoserina lactona)	19,0	7-9
C10-HSL (<i>N</i> -decanoil-homoserina lactona)	31,2	12-13
C12-HSL (<i>N</i> -dodecanoil-homoserina lactona)	34,2	13-14
C14-HSL (<i>N</i> -tetradecanoil-homoserina lactona)	38,7	15-17

Los tiempos de retención (tr) para algunos estándares están indicados en la última columna.

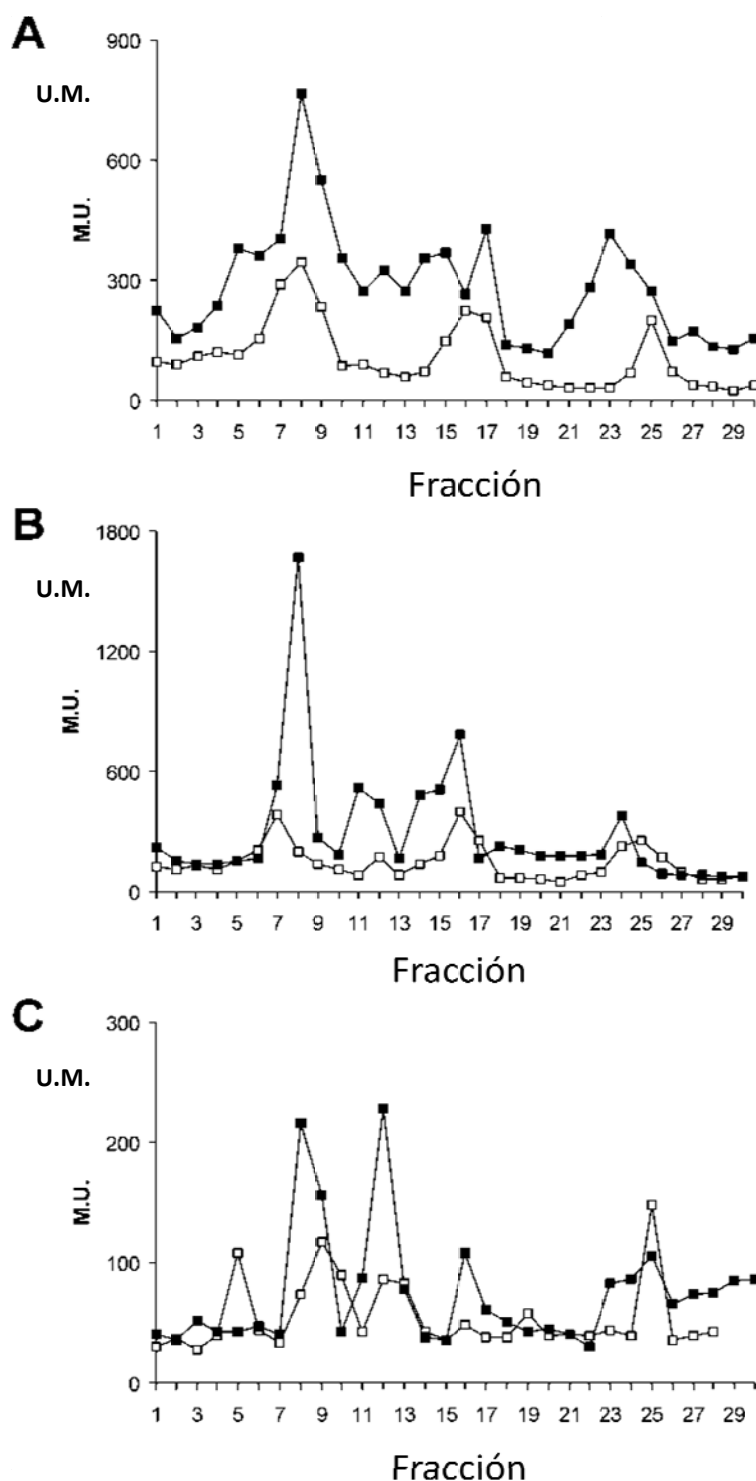


Figura 4.31. Ensayos de actividad β -galactosidasa de fracciones obtenidas por HPLC de extractos de sobrenadantes bacterianos. La inducción del biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) se midió mediante actividad β -galactosidasa (U.M.). Las fracciones ensayadas provienen de los extractos de sobrenadantes bacterianos de SMH12 (A), ISP42 (B) e IS123 (C), sin flavonoides (cuadrado blanco) o con flavonoide inductor de los genes de nodulación (cuadrado negro): genisteína para SMH12, apigenina para ISP42 y daidzeína para IS123.

4.2.2.5.- Análisis mediante espectrometría de masas

Los análisis de HPLC acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) se realizaron a partir de cultivos de las tres estirpes bacterianas crecidas sin flavonoides y con los flavonoides inductores de los genes de nodulación previamente seleccionados.

A partir de los sobrenadantes de *S. fredii* SMH12 cultivada con genisteína se obtuvieron cromatogramas, tanto por el método MRM como por el método ión precursor, con tres picos cromatográficos: el primero a los 18,31 min, el segundo a los 26,75 min y el último de ellos, en mucha menos proporción que los anteriores picos, a los 35,28 min (Figura 4.32.). Sin embargo, como se describió en el apartado 4.1.3., en los cromatogramas de sobrenadantes de cultivos sin flavonoides únicamente aparecen los dos primeros picos cromatográficos.

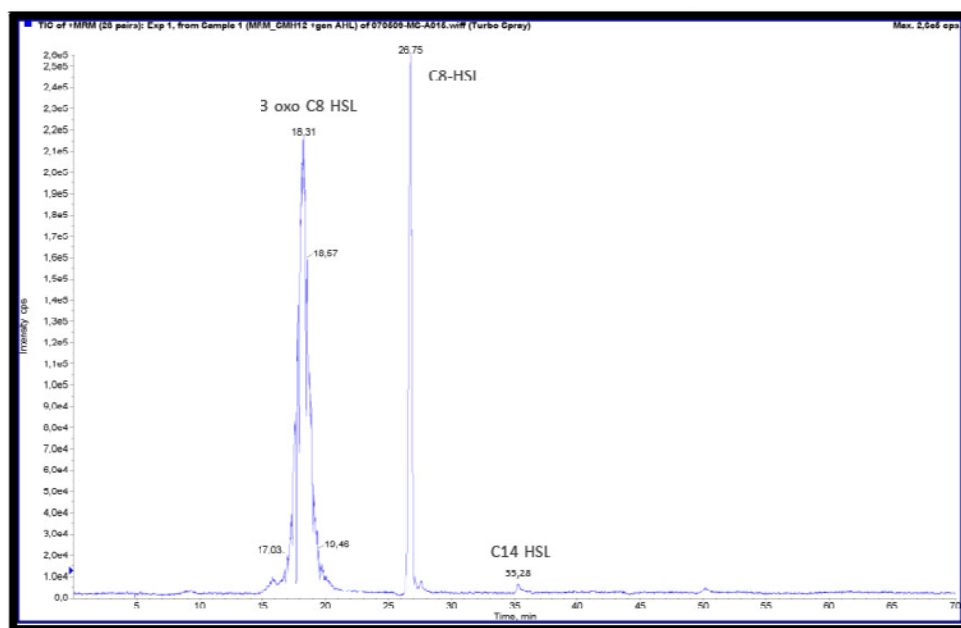


Figura 4.32. Cromatograma MRM de los AI aislados de SMH12 crecidos en presencia de genisteína. Se observan dos picos cromatográficos. El pico que de los 18,31 min corresponde a la 3-oxo-C8-HSL, el pico cromatográfico de los 26,75 min corresponde a la C8-HSL y el de los 35,28 min a la C14-HSL.

Los EPI de los demás picos cromatográficos no se corresponden con moléculas de tipo AHL deben corresponder a componentes del propio medio de cultivo dado que también se encontraron en los estudios realizados con los medios como controles. La comparación de los tiempos de retención y de los EPI de estos picos con respecto a los

de los patrones indicó que el primero de ellos se corresponde con la 3-oxo-C8-HSL, el segundo con la C8-HSL y, el último, a la C14-HSL. Así pues, en los cultivos de SMH12 crecidos en presencia de genisteína se detecta una nueva AHL, la C14-HSL, si bien puede deberse a que la concentración en presencia del flavonoide inductor alcanza un valor suficiente para ser detectada mediante espectrometría de masas.

En el caso de ISP42 y IS123, los cromatogramas de MRM y de EPI fueron similares tanto para sobrenadantes de cultivos sin flavonoides como para sobrenadantes de cultivos con flavonoide inductor de los genes de nodulación (Apartado 4.1.3.).

Todos estos resultados están resumidos en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. AHL detectadas mediante HPLC-MS/MS.

Estirpe	Sin flavonoides	Con flavonoide inductor
<i>Sinorhizobium fredii</i> SMH12	C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL	C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, C14-HSL
<i>Rhizobium etli</i> ISP42	C8-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C14-HSL	C8-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C14-HSL
<i>Rhizobium sulae</i> IS123	C8-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL	C8-HSL, 3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL

Los flavonoides inductores de los genes de nodulación en SMH12, ISP42 e IS134 son genisteína, apigenina y daidzeína, respectivamente.

4.2.2.6.- Cuantificación mediante qPCR de la expresión de genes de síntesis de AI

Una vez demostrada la influencia de los flavonoides inductores de los genes *nod* en el incremento de la producción de AI en los sobrenadantes de las tres estirpes bacterianas, se investigó si este incremento se correlacionaba con una mayor expresión de los genes de síntesis de AHL (homólogos a *luxI*) mediante qRT-PCR. Para los ensayos de qRT-PCR se diseñaron cebadores específicos a partir de los genes de síntesis de AHL que habían sido detectados anteriormente [*traI* (SMH12), *rail* y *cinI* (ISP42)] (Tabla 3.3.).

Los resultados de qRT-PCR (Figura 4.33.) mostraron que la expresión de los genes *trai* de SMH12, *cinI* y *rail* de ISP42 se incrementó significativamente (6 veces, 7 veces y 4 veces respectivamente) en presencia de los respectivos flavonoides inductores de los genes de nodulación (daidzeína en SMH12 y apigenina en el caso de ISP42) comparados con los controles sin flavonoides o con el flavonoide no inductor (umbeliferona para ambas bacterias) en cultivos crecidos a 28 °C hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5.

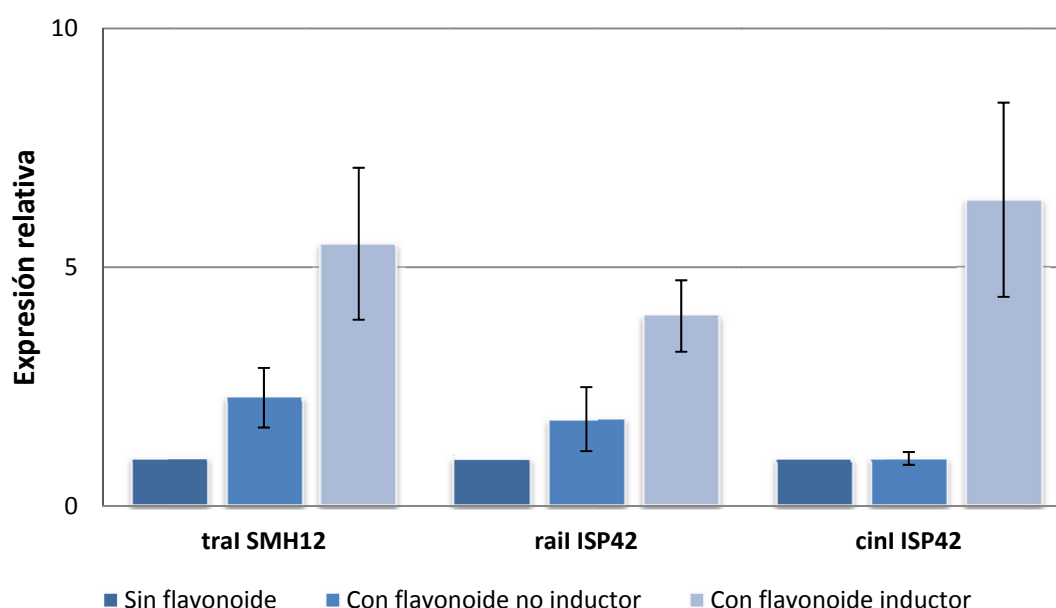


Figura 4.33. Análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión de los genes de síntesis de AI de *S. fredii* SMH12 (*trai*) y *R. etli* (*rail* y *cinI*). Los datos de expresión génica mostrados son la media (con las desviaciones típicas de las medias) para tres replicas biológicas. La expresión fue calculada en relación a la expresión sin flavonoides (barras azul oscuro). Los flavonoides inductores de los genes de nodulación fueron daidzeína en el caso de SMH12 y apigenina en ISP42. El flavonoide no inductor de los genes de nodulación usado fue umbeliferona para ambas bacterias.

Los experimentos realizados indican que los flavonoides inductores de los genes de nodulación generan un incremento en la producción total de AI en los tres rizobios estudiados y que, en el caso de SMH12 y ISP42, este incremento se debe a una mayor expresión de los genes de síntesis de AI detectados, *trai* para SMH12 y *rail* y *cinI* para ISP42.

4.2.3.- Curvas de crecimiento

Los sistemas de QS bacteriano dependen de la densidad celular, por lo tanto, para descartar que los cambios cuantitativos y cualitativos observados en la producción total de AI en presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación se deban a diferencias en el crecimiento en presencia de dichos flavonoides, se determinó la influencia de los flavonoides genisteína, apigenina y daidzeína en el crecimiento de SMH12, ISP42 e IS123 respectivamente. Para ello se realizaron curvas de crecimiento de las tres bacterias en medio YM(3) en ausencia y presencia de los respectivos flavonoides inductores de los genes de nodulación.

Los resultados indicaron que, en ninguna de las tres estirpes estudiadas, la presencia de flavonoides afectó al crecimiento de la bacteria (Figura 4.34.). Las tres estirpes, tanto con flavonoides como sin ellos, mostraron en la fase estacionaria de crecimiento densidades ópticas a 600 nm en torno a 1, si bien SMH12 fue la más rápida en alcanzarla (20 horas), seguida de IS123 (22 horas), y por último ISP42 (26 horas). Por último, tanto en SMH12 como en ISP42 se observó una fase de latencia de 4 y 11 horas respectivamente.

La presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación no afectó al crecimiento en ninguna de las tres estirpes en estudio, por lo que podemos concluir que los flavonoides inducen los genes de síntesis de AI en *S. fredii* SMH12 y en *R. etli* ISP42 haciendo que aumente la producción de AI.

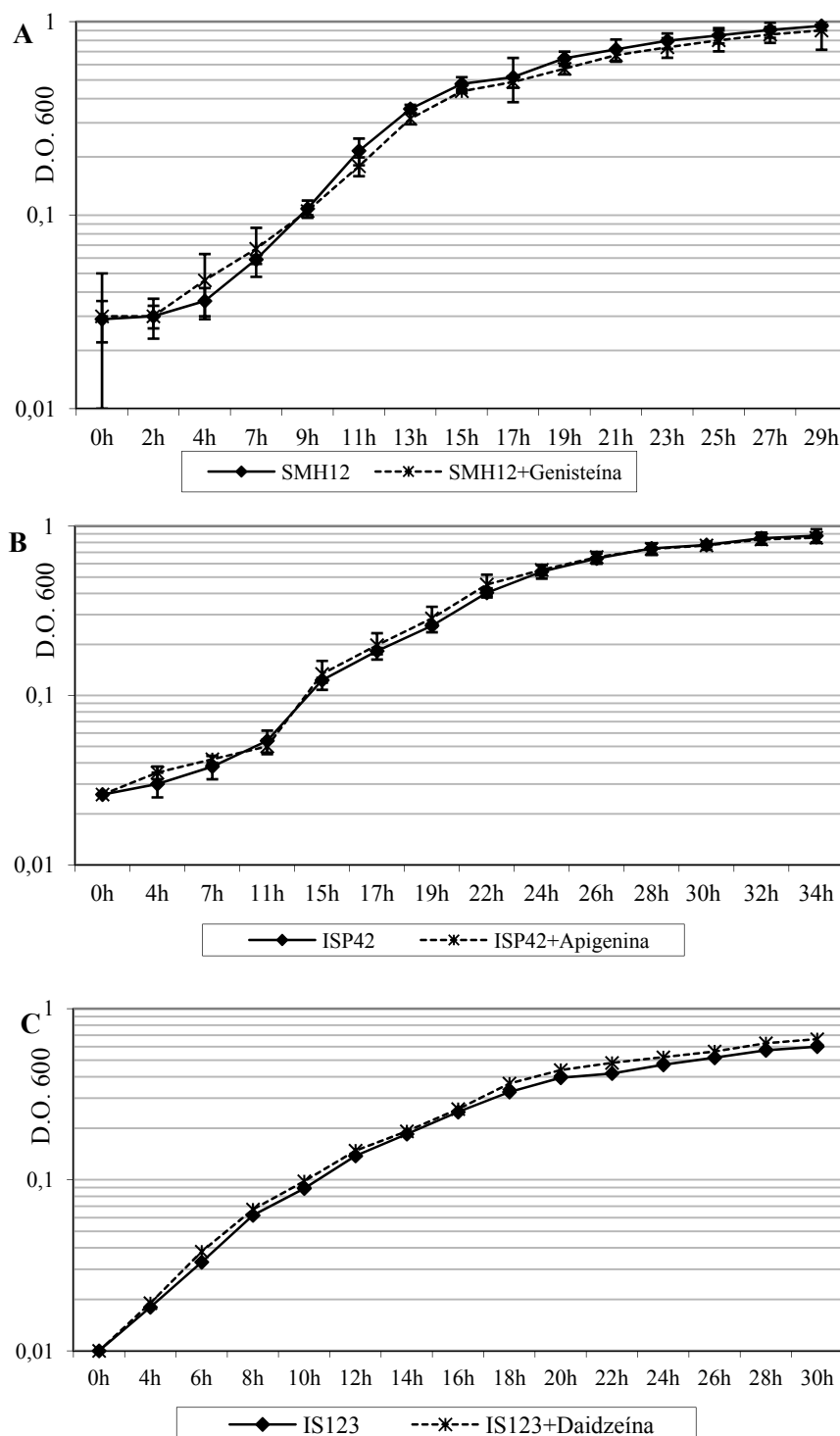


Figura 4.34. Efecto de los flavonoides inductores de los genes de nodulación sobre el crecimiento bacteriano. Las bacterias *S. fredii* SMH12 (A), *R. etli* ISP42 (B), y *R. sultae* IS123 (C) fueron crecidas en medio de cultivo YM(3) sin flavonoides (rombos negros) o con flavonoides inductores (cuadrado blanco). Los gráficos representan la media de 2 experimentos independientes llevados a cabo por triplicado (\pm desviación típica de la media).

4.3.- Papel de los sistemas de QS en la simbiosis con la leguminosa

Para estudiar el papel de los sistemas de QS sobre la simbiosis con las leguminosas se llevaron a cabo ensayos de nodulación de SMH12 e ISP42 y sus derivados deficientes en QS con plantas de soja y judía, respectivamente. En SMH12 y sus derivados, además, se estudiaron otros fenotipos importantes en la interacción simbiótica.

4.3.1.- Fenotipos simbióticos

En los rizobios, la transferencia de plásmidos, la producción de polisacáridos de superficie, la inhibición del crecimiento, la adaptación a la fase estacionaria, la eficiencia de nodulación, el desarrollo del simbiosoma o la fijación de nitrógeno están controlados mediante QS y todos ellos son importantes para el éxito de la simbiosis con la leguminosa. *Sinorhizobium fredii* SMH12 es un rizobio de amplio rango de hospedador que puede establecer una simbiosis eficiente con la soja (*Glycine max* (L.) Merril). Para conocer la importancia de los sistemas de QS de SMH12 en la simbiosis con la soja se llevaron a cabo ensayos de nodulación entre SMH12 y sus derivados, los mutantes *trai* y *nodD1*, y la estirpe que expresa la enzima lactonasa, con *Glycine max* cv Osumi. Los resultados (Figura 4.35. y Figura 4.36.) mostraron que en SMH12 (pME6863), que expresa la enzima lactonasa, se apreció un descenso significativo ($\alpha=5\%$) del 40% en número de nódulos respecto al silvestre. En cuanto al peso fresco de los nódulos y el peso seco de la parte aérea se observó la misma tendencia anterior, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por otra parte, en el mutante *trai* (SVQ646), se apreció un descenso en los tres parámetros estudiados (peso seco de la parte aérea, número y peso seco de los nódulos), si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por último, se demostró, como cabía esperar, que la estirpe SVQ648 (mutada en el gen *nodD1*) no nodula con la leguminosa, siendo los parámetros simbióticos similares a los del no inóculo (Figuras 4.35. y 4.36.) y estadísticamente diferentes a los de la estirpe silvestre.

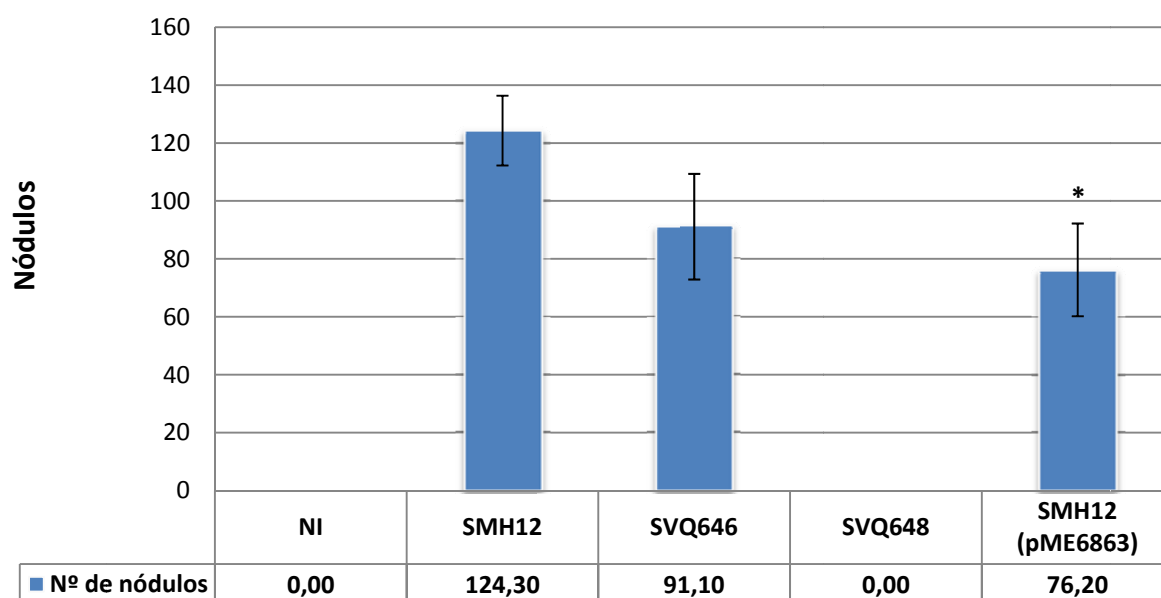


Figura 4.35. Número de nódulos de SMH12, SVQ646, SVQ648 y SMH12 (pME6863) en la simbiosis con soja cv. Osumi. Los datos del número de nódulos por planta mostrados son la media (con las desviaciones típicas de las medias) de 10 plantas. Los distintos valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación. Los mutantes se compararon individualmente con su estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha=5\%$.

A pesar de no tener un rango de nodulación tan amplio como SMH12, *Rhizobium etli* ISP42 es capaz de nodular en un número moderado de leguminosas, siendo especialmente eficiente en la nodulación de la judía. Los ensayos de nodulación de esta bacteria y sus derivados deficientes en QS se llevaron a cabo en *Phaseolus vulgaris* cv BBL. Los resultados (Figuras 4.37. y 4.38.) indicaron una tendencia a un menor número de nódulos, del peso fresco de los mismos y especialmente del peso seco de la parte aérea en la bacteria que porta el plásmido que contiene el gen que expresa la enzima lactonasa, ISP42 (pME6863), respecto a las inoculadas con la estirpe silvestre. Si bien, en ninguno de los parámetros estudiados las diferencias fueron estadísticamente significativas. En el caso del mutante en el gen de síntesis de AHL *railI*, los parámetros simbióticos estudiados no se diferenciaron de los de la estirpe silvestre.

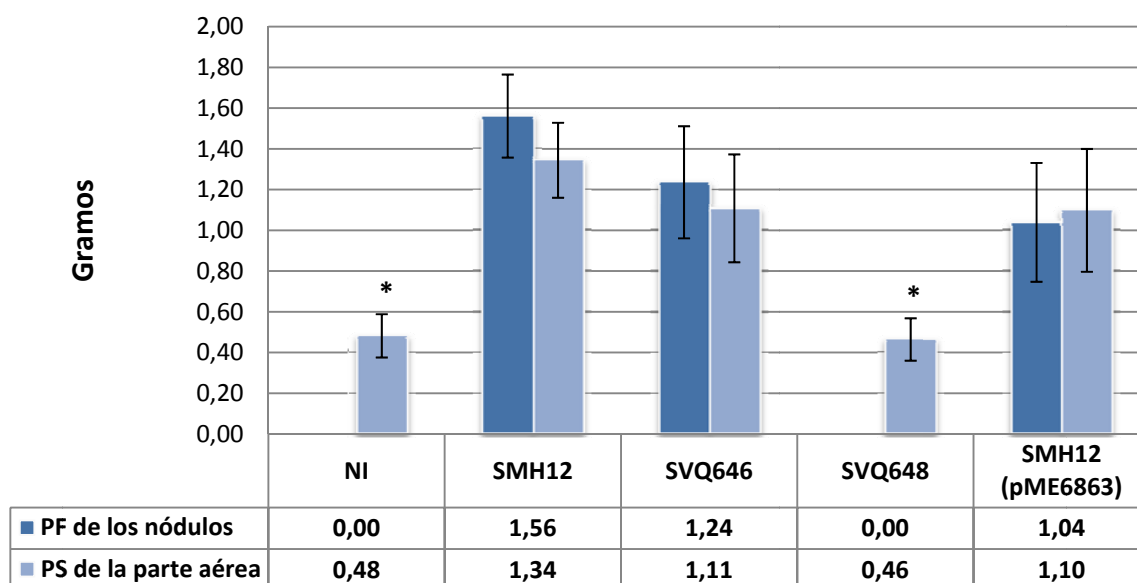


Figura 4.36. Peso fresco de los nódulos y peso seco de la parte aérea de SMH12, SVQ646, SVQ648 y SMH12 (pME6863) en la simbiosis con soja cv. Osumi. Los datos del Peso Fresco (PF) de los nódulos y del Peso Seco (PS) de la parte aérea representados por planta son la media (con las desviaciones típicas de las medias) de 10 plantas. Los distintos valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación. Los mutantes se compararon individualmente con su estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha=5\%$.

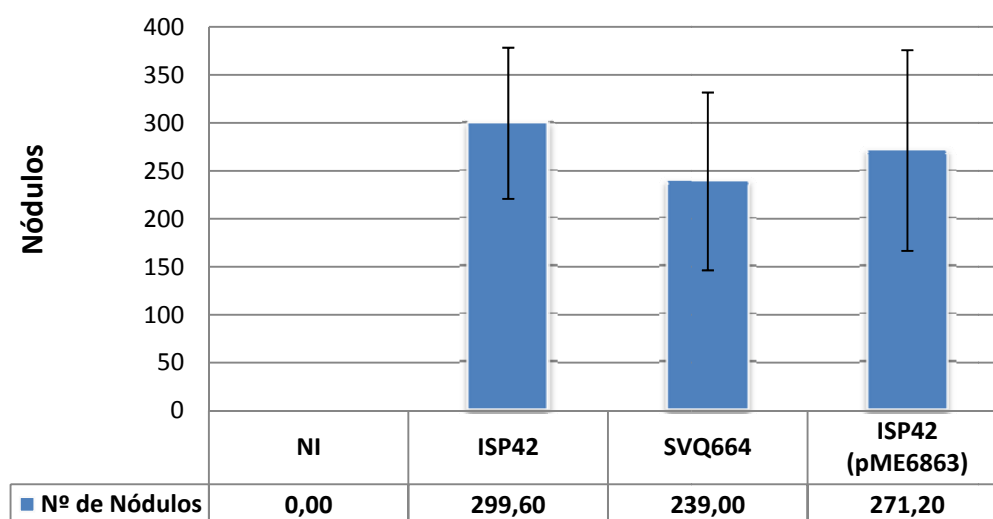


Figura 4.37. Número de nódulos de ISP42, SVQ664 y ISP42 (pME6863) en la simbiosis con judía cv. BBL. Los datos del número de nódulos por planta mostrados son la media (con las desviaciones típicas de las medias) de 10 plantas. Los distintos valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación. Los mutantes se compararon individualmente con su estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

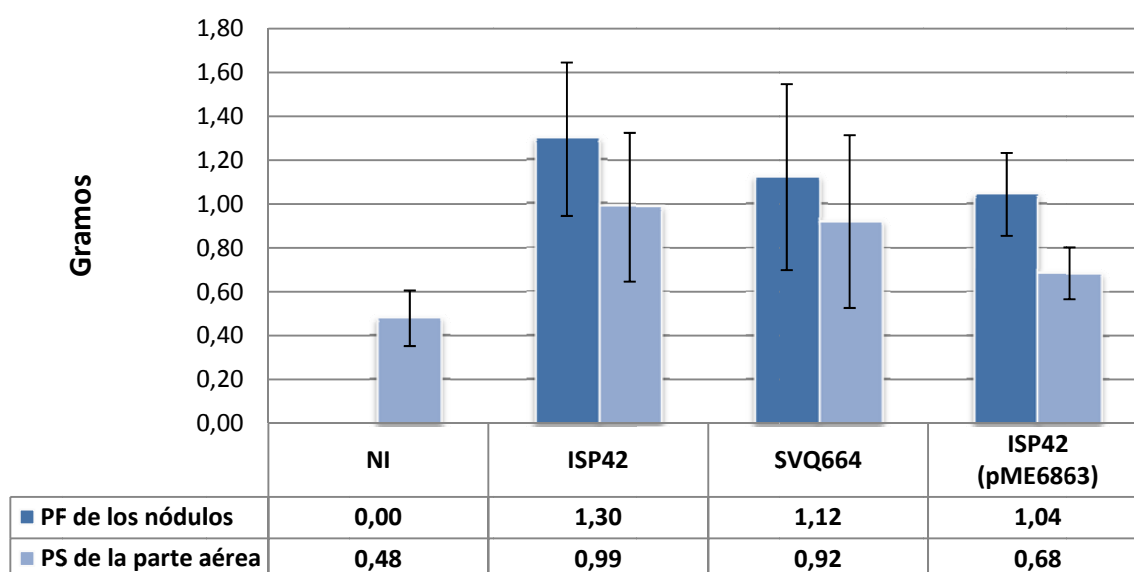


Figura 4.38. Peso fresco de los nódulos y Peso seco de la parte aérea de ISP42, SVQ664 y ISP42 (pME6863) en la simbiosis con judía cv. BBL. Los datos del PF de los nódulos y del PS de la parte aérea representados por planta son la media (con las desviaciones típicas de las medias) de 10 plantas. Los distintos valores se tomaron 6 semanas después de la inoculación. Los mutantes se compararon individualmente con su estirpe parental usando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Estos resultados indican que si bien tanto en SMH12 como en ISP42 la expresión del gen que codifica la enzima lactonasa afecta negativamente a la nodulación, es únicamente en el derivado de *S.fredii* SMH12 donde estas diferencias son estadísticamente significativas. Por esta razón, se eligió a SMH12 y sus derivados deficientes en QS para estudiar el resto de fenotipos bacterianos que afectan de una u otra manera a la simbiosis con la planta, para inferir una posible regulación de los mismos por los sistemas de QS bacteriano.

4.3.2.- Influencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación sobre el gen *trai* en diferentes fondos genéticos de SMH12

En primer lugar, para conocer si en la activación del gen *trai* en presencia del flavonoide inductor daidzeína (casi 5 veces en relación a la expresión del gen en cultivos sin flavonoide) (Figura 4.33.) tiene lugar a través del gen *nodD1*, se estudió

mediante qPCR la expresión del gen *traI* en la estirpe mutante *nodD1* (SVQ648) y en la estirpe que porta el plásmido pME6863. Los cebadores TraI-RT y 16S-RT usados para este experimento están recogidos en la Tabla 3.3. Los resultados (Figura 4.39.) mostraron que la expresión del gen *traI* en SVQ648, tanto en presencia como ausencia del flavonoide inductor daidzeína, presentaba valores similares a la de la expresión del gen en la estirpe silvestre en presencia del flavonoide inductor. Por el contrario en la estirpe que expresa la enzima lactonasa, incluso en presencia de daidzeína, la expresión del gen *traI* tiene niveles similares a la estirpe silvestre sin flavonoide.

Estos datos parecen indicar que en SMH12 el incremento de la expresión del gen de síntesis de AHL *traI* en ausencia de flavonoide está regulada negativamente por NodD1. La presencia de flavonoides inductores, permitirían que la proteína NodD1 iniciase la expresión de los genes de nodulación, dejando así de regular negativamente la expresión de *traI*. Por otro lado, el incremento en la expresión de *traI* en presencia de daidzeína, requiere que la concentración de AHL sea la adecuada, ya que la degradación de estos AI por la enzima lactonasa hace que los niveles de expresión de *traI* (con o sin flavonoides) sean similares a los de la estirpe silvestre sin flavonoides. Esto puede deberse a que en los sistemas de QS la proteína de tipo LuxR activada por el AI induce la expresión de una serie de genes, entre los que se encuentra el propio *luxI* (“feed-back” positivo).

La mutación en el gen *nodD1* de SMH12 conllevó una mayor expresión del gen de síntesis de AHL *traI*, tanto en presencia como en ausencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación, por lo que parece que NodD1 regula negativamente la expresión de *traI*. La mayor expresión de *traI* en presencia de flavonoides específicos requiere de sistemas de QS funcionales, ya que en la estirpe que expresa la enzima lactonasa, aun en presencia de flavonoides inductores, la expresión del gen *traI* no se afecta.

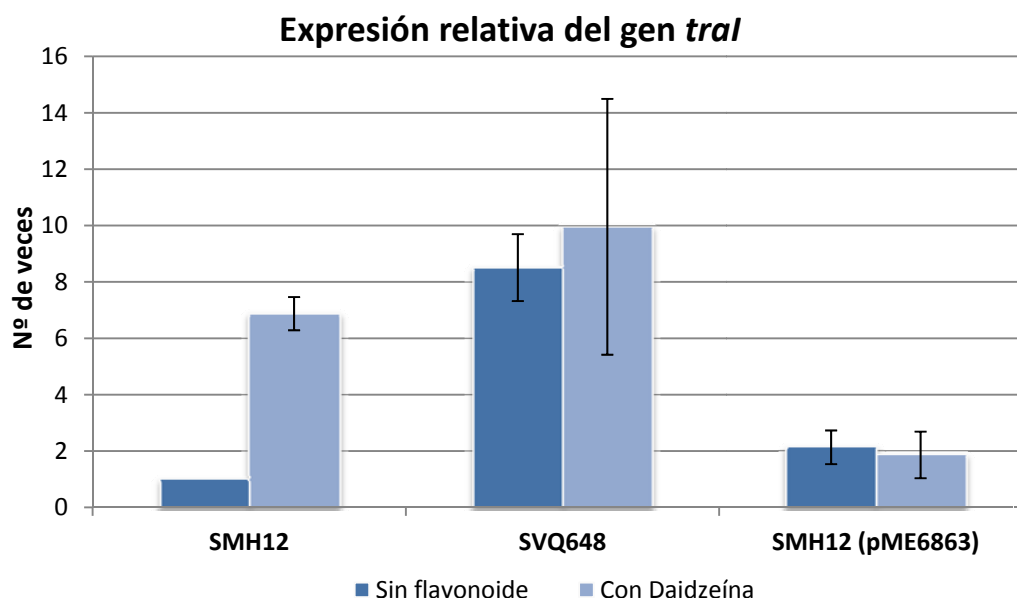


Figura 4.39. Análisis cuantitativo por RT-PCR de la expresión del gen *tral* en SMH12, *nodD1* (SVQ648) y el portador del gen de la lactonasa [SMH12 (pME6863)]. Los datos de expresión génica mostrados son la media (con las desviaciones típicas de las medias) para tres replicas biológicas. La expresión fue calculada en relación a la expresión sin flavonoides del silvestre SMH12 (barras azul oscuro). El flavonoide inductor de los genes de nodulación fue la daidzeína.

4.3.3.- Proteínas extracelulares

El Sistema de Secreción de Tipo III y las proteínas Nop que se secretan a través de él son unos de los mecanismos bacterianos que determinan la eficiencia y el rango de nodulación de los rizobios que presentan este sistema (Lopez-Baena *et al.*, 2009). Los estudios previos llevados a cabo en la estirpe *S.fredii* HH103, muy relacionada filogenéticamente con SMH12, mostraron que, en presencia de genisteína, HH103 secreta al menos 8 proteínas Nop (Lopez-Baena *et al.*, 2008). Estudios mediante geles de poliacrilamida al 12 % teñidos con plata mostraron que en SMH12, al menos se secretan 5 proteínas Nop (Figura 4.40.). Estas proteínas tienen tamaños aproximados de 60, 42, 40, 37 y 21 kDa. Además, se observó que ni en el mutante *tral* ni en la estirpe que expresa la enzima lactonasa se afecta la producción de proteínas Nop, tanto con el flavonoide genisteína como sin él.

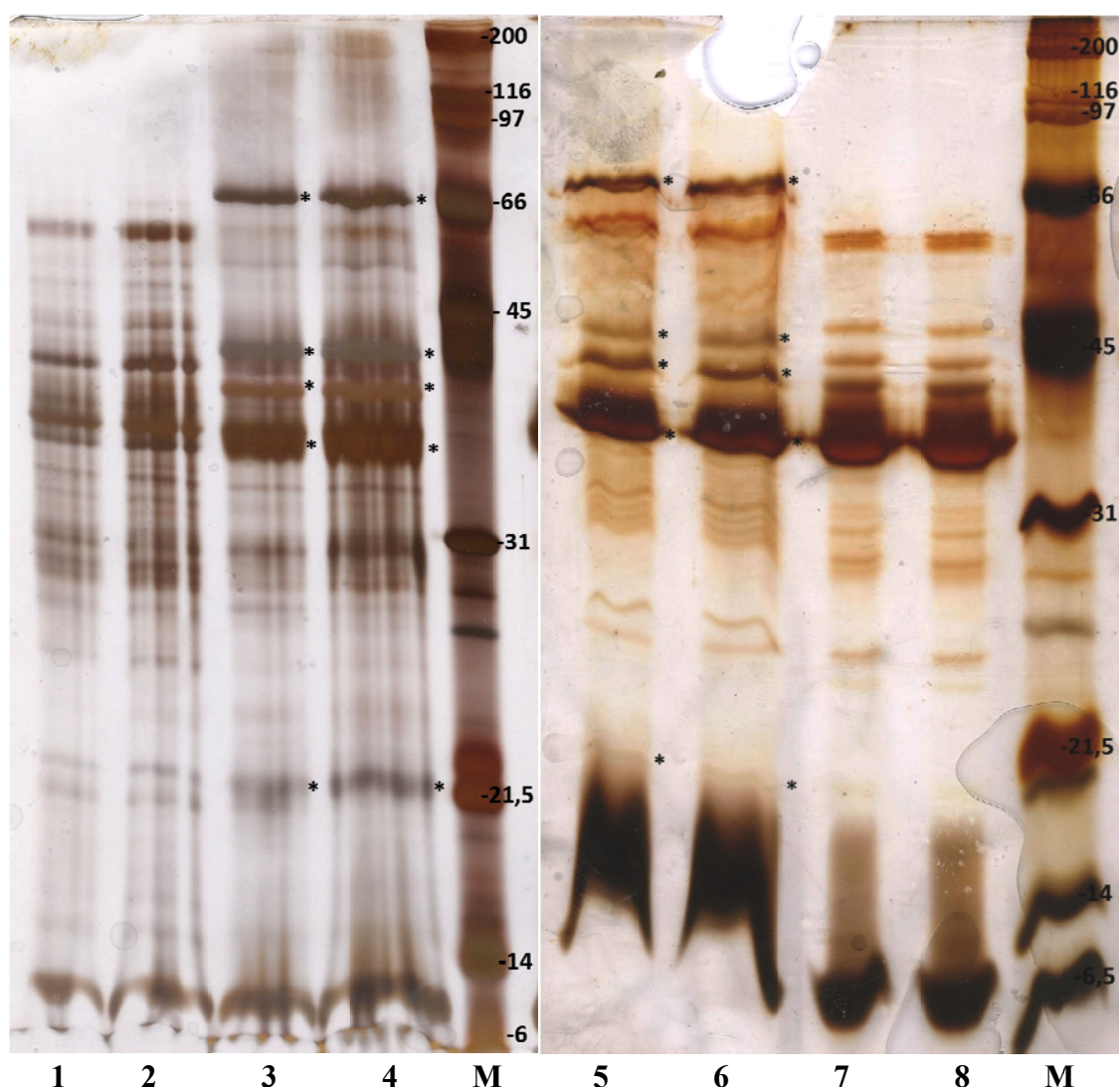


Figura 4.40. Perfil de proteínas extracelulares de *S.fredii* SMH12 y de derivados deficientes en QS. Carriles 1, 3, 5 y 7: SMH12. Carriles 2 y 4: SMH12(pME6863). Carriles 6 y 8: SVQ646 (=SMH12 *traI::lacZ-Gm^R*). Carriles 3, 4, 5 y 6: proteínas extracelulares de cultivos crecidos en presencia de genisteína 3,7 μ M. M: marcador de masa molecular (Bio-Rad). Las masas moleculares (kDa) del marcador están indicadas a la izquierda de la figura. Las proteínas cuya secreción depende del flavonoide genisteína están marcadas con un asterisco.

Los resultados indican *S. fredii* SMH12 secreta al menos 5 proteínas Nop y que las AHL no afectan a la secreción de estas proteínas extracelulares en SMH12.

4.3.4.- Polisacáridos superficiales: Exopolisacáridos y Lipopolisacáridos

Se ha descrito que en *S.meliloti* Rm1021 y Rm41, la invasión de la planta por parte del rizobio requiere de al menos uno de los dos exopolisacáridos importantes simbióticamente, el succinoglucano y el EPSII (Mueller y Gonzalez, 2011). Marketon *et al.* (2003) demostraron que el sistema de QS *sinR/sinI*, implicado en la producción de AHL de cadena larga como la 3-oxo-C14-HSL, regula la producción del EPSII, siendo el mutante *sinI* deficiente en la simbiosis respecto a la estirpe silvestre. Por ello, se estudió si la estirpe de SMH12 que expresa la enzima lactonasa presentaba alguna alteración en la producción de exopolisacáridos (EPS) o lipopolisacáridos (LPS) superficiales respecto a la estirpe silvestre. Como se puede ver en la figura 4.41., los LPS no presentaron cambios destacables en la estirpe SMH12 (pME6863) respecto a la estirpe silvestre, tanto en ausencia como en presencia del flavonoide daidzeína. En el caso de la producción de EPS, la presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación (daidzeína), y en menor medida, la de flavonoides no inductores de los genes de nodulación (umbeliferona), provocó en las bacterias una menor mucosidad respecto a las bacterias crecidas sin flavonoides, tanto en la estirpe silvestre SMH12 como en el derivado SMH12(pME6863).

Los resultados indican que las AHL no influyen de forma apreciable en la producción de EPS y LPS en *S.fredii* SMH12.

4.3.5.- Movilidad bacteriana tipo swimming

Otro de los mecanismos regulados mediante los sistemas de QS, y que está implicado en una correcta colonización de la raíz, es la movilidad bacteriana (Daniels *et al.* 2004). En esta tesis se han realizado estudios de movilidad bacteriana tipo swimming con la estirpe silvestre SMH12 y sus derivados dado que no se ha detectado movilidad de tipo swarming. Para ello, se realizaron estudios inoculando las bacterias en medio YMA 0,3% con y sin flavonoide y midiendo el diámetro de expansión de la colonia cada 24 horas durante 8 días.

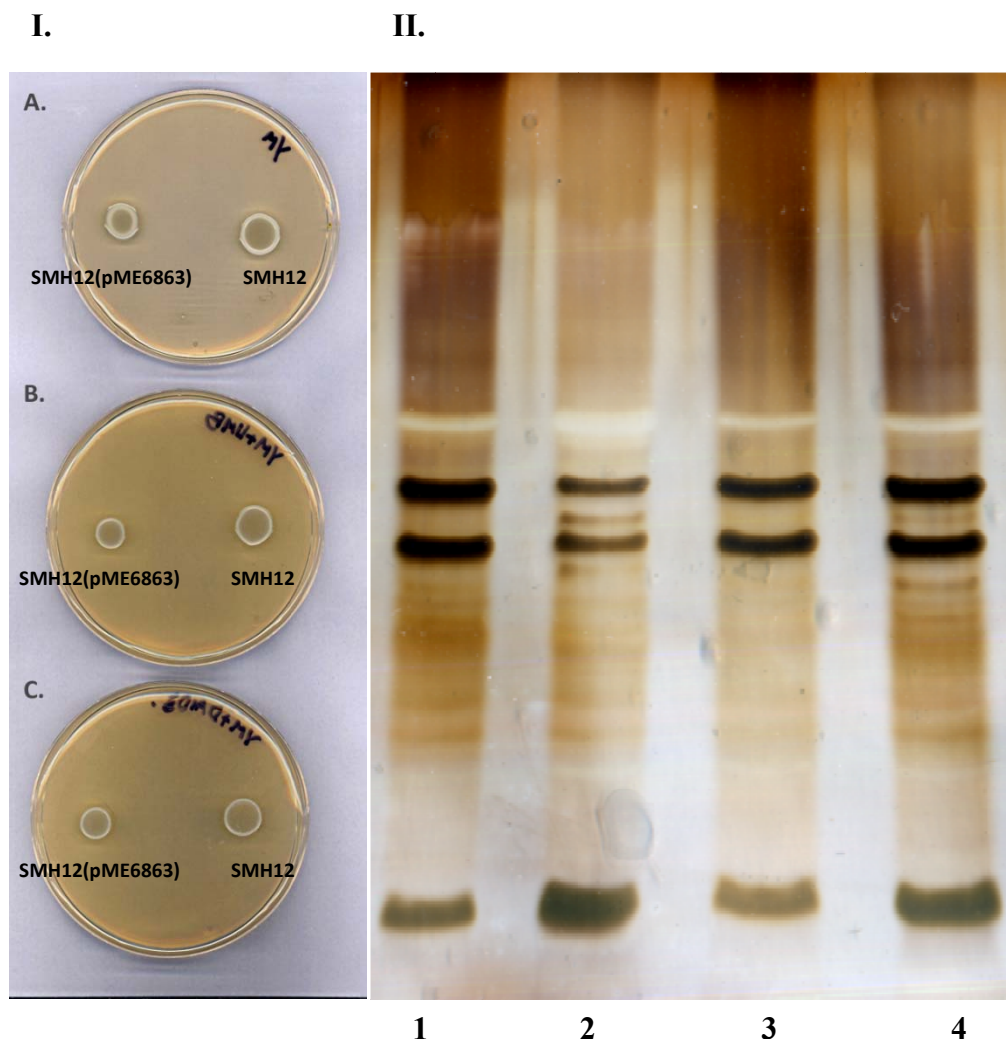


Figura 4.41. Producción de EPS y perfil de LPS de *S.fredii* SMH12 y del derivado que expresa la enzima lactonasa. I. Producción de EPS en medio YM sin flavonoides (A), en medio YM suplementado con umbeliferona (B) y en medio YM suplementado con daidzeína (C). En todos los casos, SMH12 aparece a la derecha y SMH12 (pME6863) a la izquierda.

II. Perfil electroforético de los LPS de: SMH12 (Carriles 1 y 2) y SMH12(pME6863) (Carriles 3 y 4). Los carriles 2 y 4 corresponden a los LPS de las respectivas bacterias crecidas en presencia de daidzeína 3,7 μ M.

Los resultados de la Figura 4.42. muestran que en ausencia de flavonoides, todas las estirpes estudiadas presentaban movilidad que ocasionaba un incremento del diámetro de crecimiento de aproximadamente de 4 mm al día durante los 8 días que duró el estudio (Figura 4.42.A). Sin embargo, si el medio se suplementaba con flavonoides, las estirpes presentaban movilidad que daba lugar a un incremento del diámetro hasta el

cuarto día, permaneciendo el diámetro de crecimiento estable a partir de ese día (Figura 4.42.B).

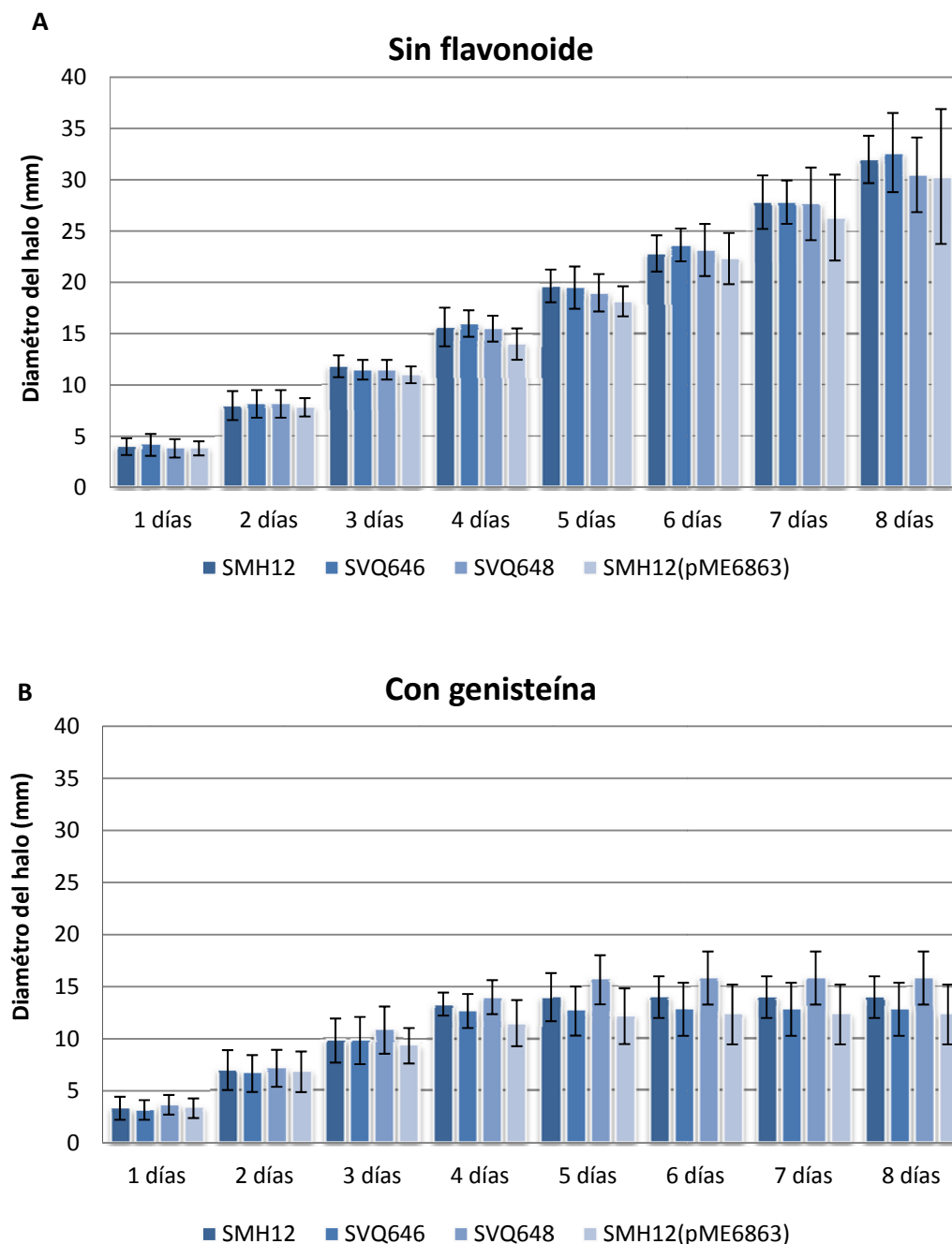


Figura 4.42. Seguimiento de la movilidad tipo swimming. Los datos de movilidad son la media (con las desviaciones típicas de las medias) de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones cada uno de las siguientes bacterias: SMH12, los mutantes en los genes *traI* (SVQ646) y *nodD1* (SVQ648), y la estirpe que porta el gen que codifica para la enzima lactonasa [SMH12(pME6863)]. A. Swimming en ausencia de flavonoides. B. Swimming en presencia de genisteína.

Para un análisis comparativo de los datos, se tomaron los valores de movilidad tipo swimming después de 7 días, en el que las diferencias de movilidad fueron máximas. Como se muestra en la figura 4.43., el swimming de las bacterias en placas con flavonoides tras 7 días era aproximadamente del 50% respecto al que muestran las bacterias en placas sin flavonoides. Además, si bien en las placas sin flavonoides apenas se apreciaban diferencias entre las diferentes estirpes, en las placas con genisteína se observó una tendencia a una mayor movilidad en el mutante *nodDI* (SVQ648) y menor movilidad tipo swimming en la estirpe SMH12 (pME6863).

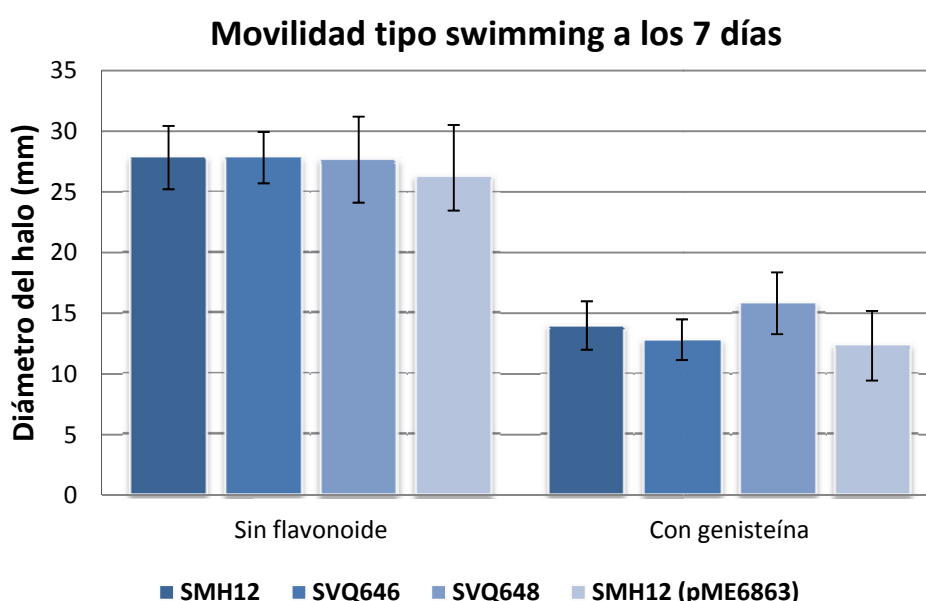


Figura 4.43. Movilidad tipo swimming a los 7 días. Los datos de movilidad son la media (con las desviaciones típicas de las medias) de 2 experimentos independientes con 3 repeticiones en cada uno de las siguientes bacterias: SMH12, los mutantes en los genes *traI* (SVQ646) y *nodDI* (SVQ648), y la estirpe que expresa la enzima lactonasa [SMH12(pME6863)].

Los resultados indican que ni las AHL ni el gen *nodDI* influyen directamente en la movilidad tipo swimming de *S.fredii* SMH12. Sin embargo, la presencia de flavonoides inductores específicos de los genes de nodulación inhibe la movilidad a partir del cuarto día.

4.3.6.- Biofilm

4.3.6.1.- Estudio de la adhesión a superficies abióticas

De manera similar a la movilidad, la formación de biofilm es crucial para una correcta colonización de la raíz de la leguminosa por el rizobio, y tiene, por lo tanto, importancia en la simbiosis bacteria-planta (Rinaudi y Giordano, 2010). La formación del biofilm, entre otros factores, está mediada por los sistemas de QS. Por esto, se estudió en las diferentes estirpes derivadas de SMH12 la formación de biofilm, tanto con flavonoides inductores de los genes de nodulación como sin ellos. Los experimentos en placas microtítulo de poliestireno sirven para medir la primera de las fases de la formación de un biofilm bacteriano, la adhesión a una superficie abiótica.

Estos experimentos (Figura 4.44.) mostraron que la presencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación reducen en casi un 80% la adhesión de la estirpe silvestre *S. fredii* SMH12 a las paredes de los pocillos tras 6 días de cultivo. Tanto en la estirpe SVQ648 (mutada en el gen *nodD1*) como en SMH12 (pME6863) la presencia de

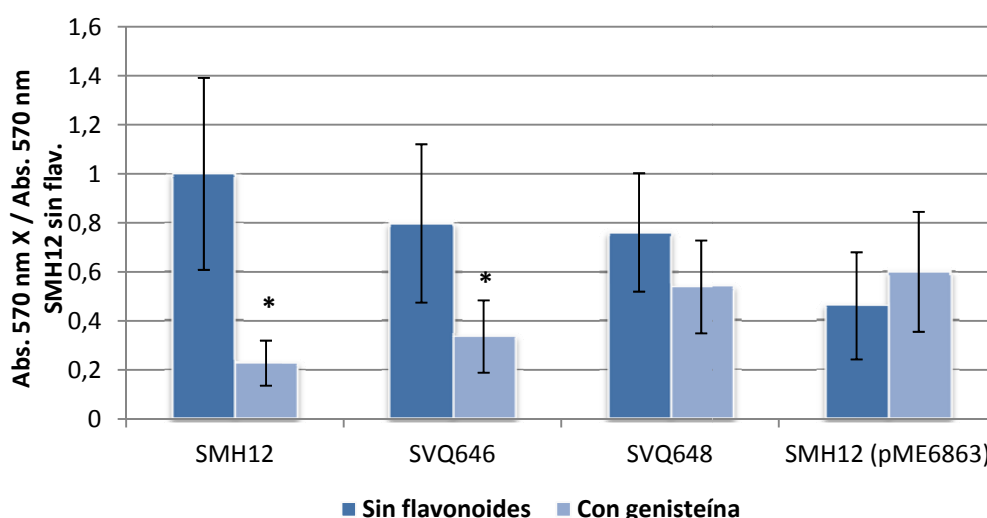


Figura 4.44. Adhesión relativa de las diferentes estirpes derivadas de SMH12 a placas microtítulo de poliestireno tras 6 días de cultivo. Los datos de adhesión relativa se hallan midiendo absorbancia a 570 nm para cada bacteria y condición, y relativizando con el valor de absorbancia de la estirpe silvestre sin flavonoide. Son la media (con las desviaciones típicas de las medias) de 6 experimentos independientes con 8 replicas cada uno. Las bacterias utilizadas fueron: SMH12, los mutantes en los genes *trnI* (SVQ646) y *nodD1* (SVQ648), y la estirpe con el gen que codifica la lactonasa [SMH12(pME6863)]. Las barras con un asterisco son significativamente diferentes a un nivel $\alpha=5\%$ usando el test no paramétrico de Mann-Whitney.

genisteína no redujo tan drásticamente la adhesión de la bacteria a los pocillos. En esta última estirpe la adhesión sin flavonoides es un 50% inferior de la que posee la estirpe parental. El mutante SVQ646 (*traI*) se comporta de manera similar al silvestre. Estos datos indican que los flavonoides inductores de los genes de nodulación inhiben el primer paso de la formación del biofilm, y esta inhibición, al menos en parte, está regulada por el gen *nodDI*. Además, parece claro que los sistemas de QS intervienen de alguna manera en esta regulación, ya que la estirpe con el gen que codifica la enzima lactonasa posee menores valores de adhesión en ausencia de flavonoides que la estirpe silvestre. En todas las estirpes y condiciones los valores de absorbancia a 600 nm, indicativos del crecimiento bacteriano, fueron similares (datos no mostrados).

4.3.6.2.- Estudios del desarrollo del biofilm mediante microscopía confocal

Para una mejor comprensión del proceso de formación de biofilm, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal para la visualización de las estructuras que se generan sobre una superficie de cristal (cámaras con pocillos Lab-Tex Chamber Slide System) a los 4, 7 y 11 días. Para ello, se introdujo un plásmido que porta el gen que codifica la proteína fluorescente verde (pMP2463) en cada una de las estirpes ensayadas, y se captaron imágenes de microscopía confocal tomando un total de 13 cortes cada 1,5 μm , obteniéndose así una imagen tridimensional del biofilm de 19 μm de grosor. Tras la reconstrucción *in silico* se obtuvieron las diferentes imágenes de formación de biofilm en portaobjetos de las estirpes con y sin flavonoides a los 4 y 7 días.

Los resultados (Figura 4.45.) mostraron que, a los 4 días sin flavonoides, el biofilm formado fue de tipo monocapa en las diferentes estirpes ensayadas, apreciándose una menor densidad celular en SMH12 (pME6863). La presencia de flavonoides, sin embargo, provocó la formación de biofilm mediante agrupación bacteriana de tipo microcolonia en diferentes zonas de los portaobjetos en todas las estirpes estudiadas excepto en el mutante en el gen *nodDI* (SVQ648). En los biofilm formados por SMH12 (pME6863), la presencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación genera biofilm intermedios entre monocapa y microcolonia.

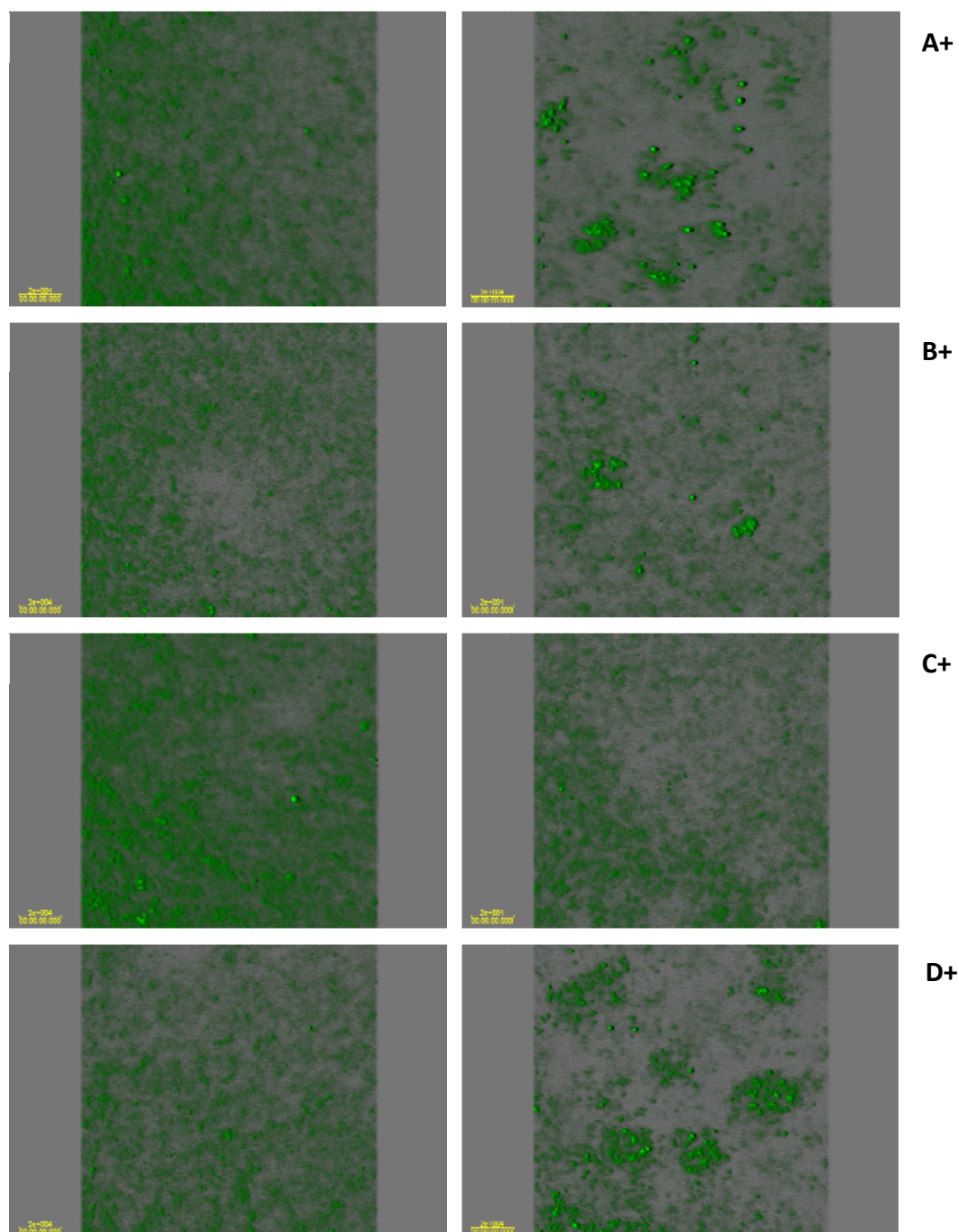


Figura 4.45. Formación de biofilm a los 4 días al microscopio confocal. Las imágenes mostradas corresponden a la reconstrucción *in silico* de 13 cortes cada 1,5 μm (19 μm en t total) usando un microscopio confocal con objetivo de 20x. A: SMH12. B: SVQ646. C: SVQ648. D: SMH12 (pME6863). -:sin flavonoides. +: con genisteína.

A los 7 días, la cantidad de biofilm formado por todas las estirpes y en todas las condiciones se incrementó, aunque los tipos de biofilm y las densidades celulares de estos fueron similares a los de los 4 días (Figura 4.46.).

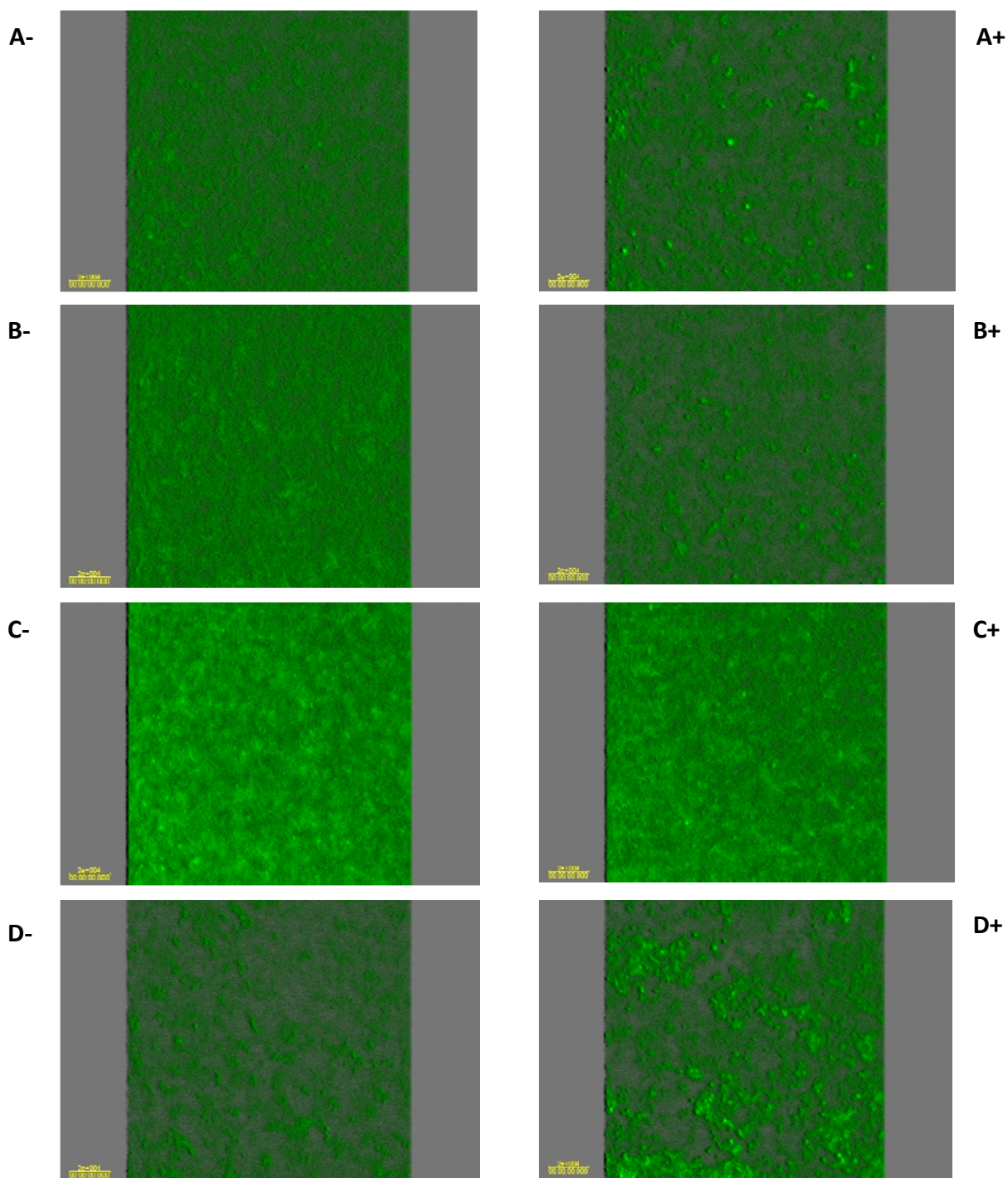


Figura 4.46. Formación de biofilm a los 7 días al microscopio confocal. Las imágenes mostradas corresponden a la reconstrucción *in silico* de 13 cortes cada 1,5 μm (19 μm en total) usando un microscopio confocal con objetivo de 20x. A: SMH12. B: SVQ646. C: SVQ648. D: SMH12 (pME6863). -:sin flavonoides. +: con genisteína.

Todos estos resultados, parecen indicar que en *S. fredii* SMH12 los flavonoides inductores de los genes de nodulación disminuyen la capacidad de adhesión a superficies abióticas. Además, el biofilm formado pasa de ser homogéneo, de tipo monocapa, a distribuirse en agrupaciones celulares, de tipo microcolonia. Ambos tipos de biofilm requieren de los sistemas de QS bacteriano para su correcta formación. Además, los biofilm de tipo microcolonia formados en presencia de flavonoides específicos son dependientes de la expresión del gen *nodD1*.

4.3.7.- Estudios de la colonización de raíces mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido

Los experimentos de movilidad y formación de biofilm indican que, la estirpe de *S. fredii* SMH12 que expresa la enzima lactonasa, disminuye la formación de biofilm y la movilidad tipo swimming con respecto a la estirpe silvestre. Por el contrario, en el mutante SVQ648, afectado en el gen *nodD1*, estos dos fenotipos parecen potenciados, especialmente en presencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación. Teniendo en cuenta estos resultados, se llevaron a cabo estudios de colonización de raíces de soja Osumi por las 4 estirpes de estudio (SMH12, SVQ646, SVQ648 y SMH12 (pME6863)) expresando la proteína fluorescente verde.

Los experimentos de microscopía de epifluorescencia (Figura 4.47.) mostraron que en todos los casos las bacterias se distribuían a lo largo de la raíz principal, pero apenas se detectó la presencia de SMH12(pME6863) en las raíces secundarias.

Estudios complementarios llevados a cabo con microscopía electrónica de barrido mostraron resultados semejantes a los obtenidos mediante microscopía de epifluorescencia: la colonización de la raíz de la leguminosa ocurrió a lo largo de toda la raíz en el caso de SMH12 y SVQ648, pero no así en el caso de SMH12 (pME6863), en el que las bacterias únicamente colonizaron la zona cercana al punto de inoculación (tronco de la raíz: zona de la raíz más cercana al tallo de la planta), estando en muy bajo número o incluso no encontrándolas en el ápice de la raíz y especialmente en las raíces laterales (Figuras 4.48., 4.49., y 4.50.).

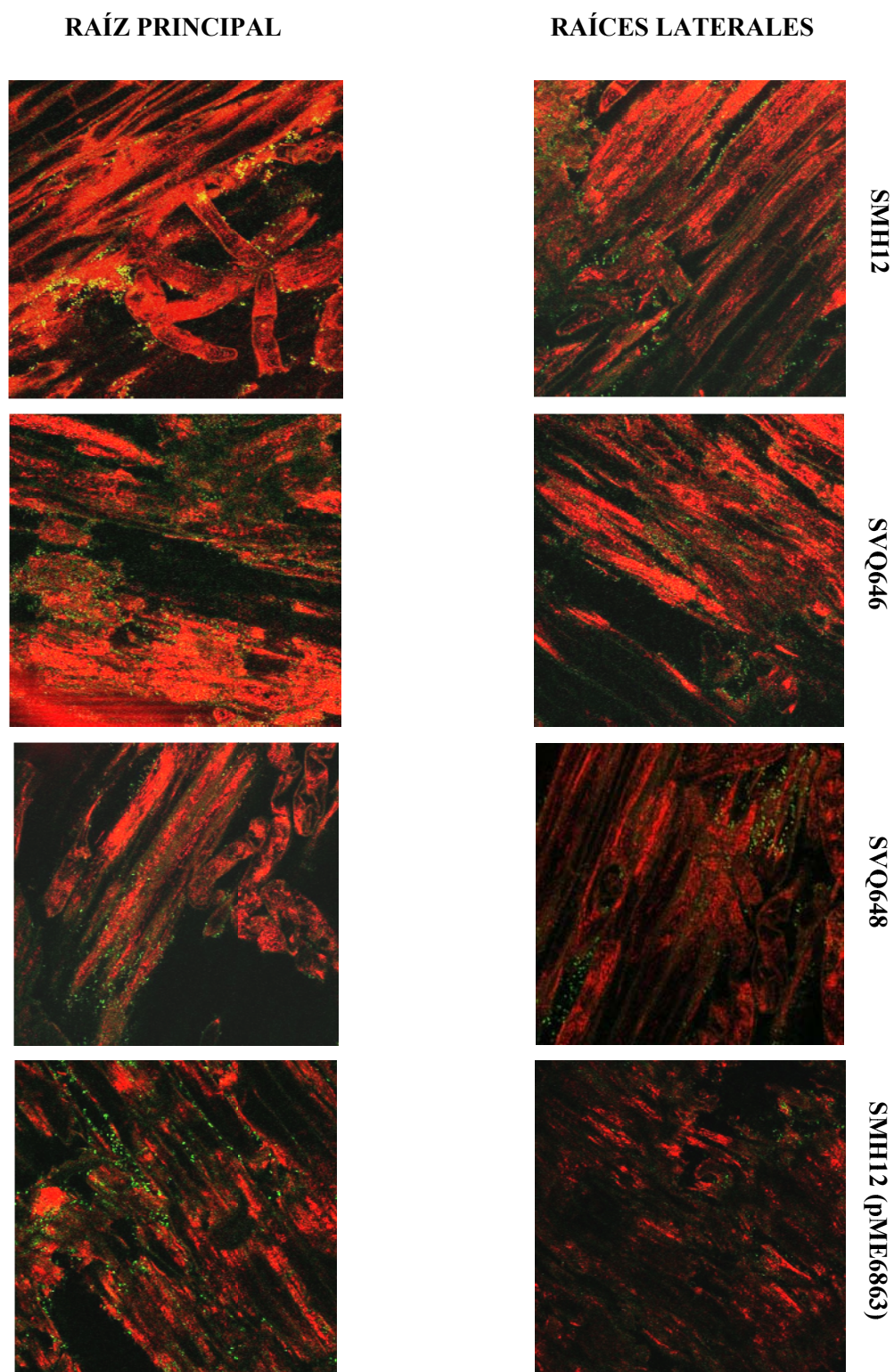


Figura 4.47. Imágenes al microscopio de epifluorescencia de la colonización de raíces de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios. Las imágenes mostradas corresponden, tras la reconstrucción *in silico*, a zonas representativas de la raíz principal (izquierda) o de las raíces laterales (derecha) con objetivo de 20x, 7 días después de ser inoculadas con SMH12, SVQ646, SVQ648 y SMH12 (pME6863).

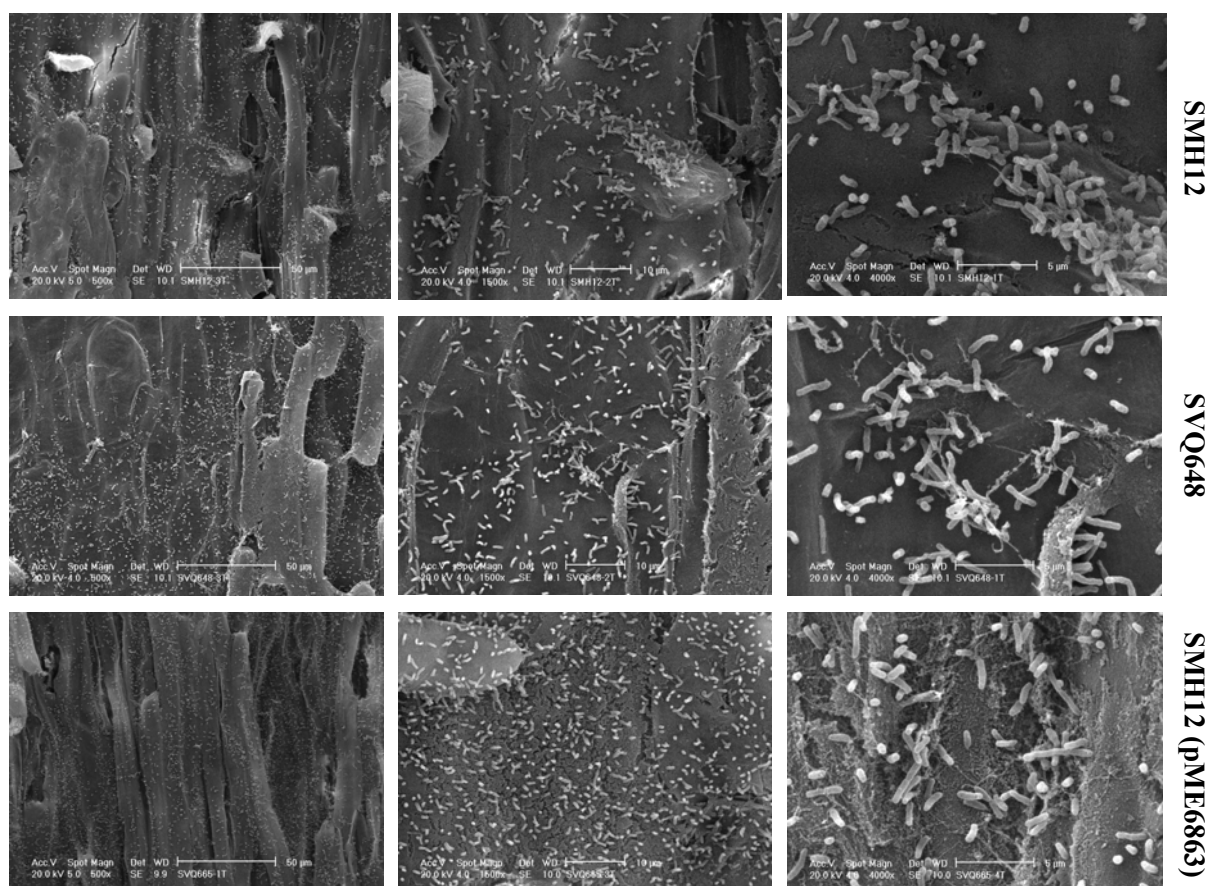


Figura 4.48. Imágenes al microscopio electrónico de barrido de la colonización del tronco de la raíz de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios. Las imágenes mostradas corresponden a zonas representativas del tronco de la raíz con diferentes aumentos 7 días después de la inoculación con SMH12, SVQ648 y SMH12(pME6863).

Las observaciones por microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido indicaron que para una correcta colonización de toda la raíz es necesario que los sistemas de QS de SMH12 sean funcionales, ya que la estirpe que expresa la enzima lactonasa apenas coloniza las raíces laterales y el ápice de la raíz.

Sin embargo, no se aprecian diferencias en la colonización de las raíces en el caso de los mutantes *traI* y *nodD1* respecto a la estirpe silvestre, ya que se distribuyen a lo largo de toda la raíz.

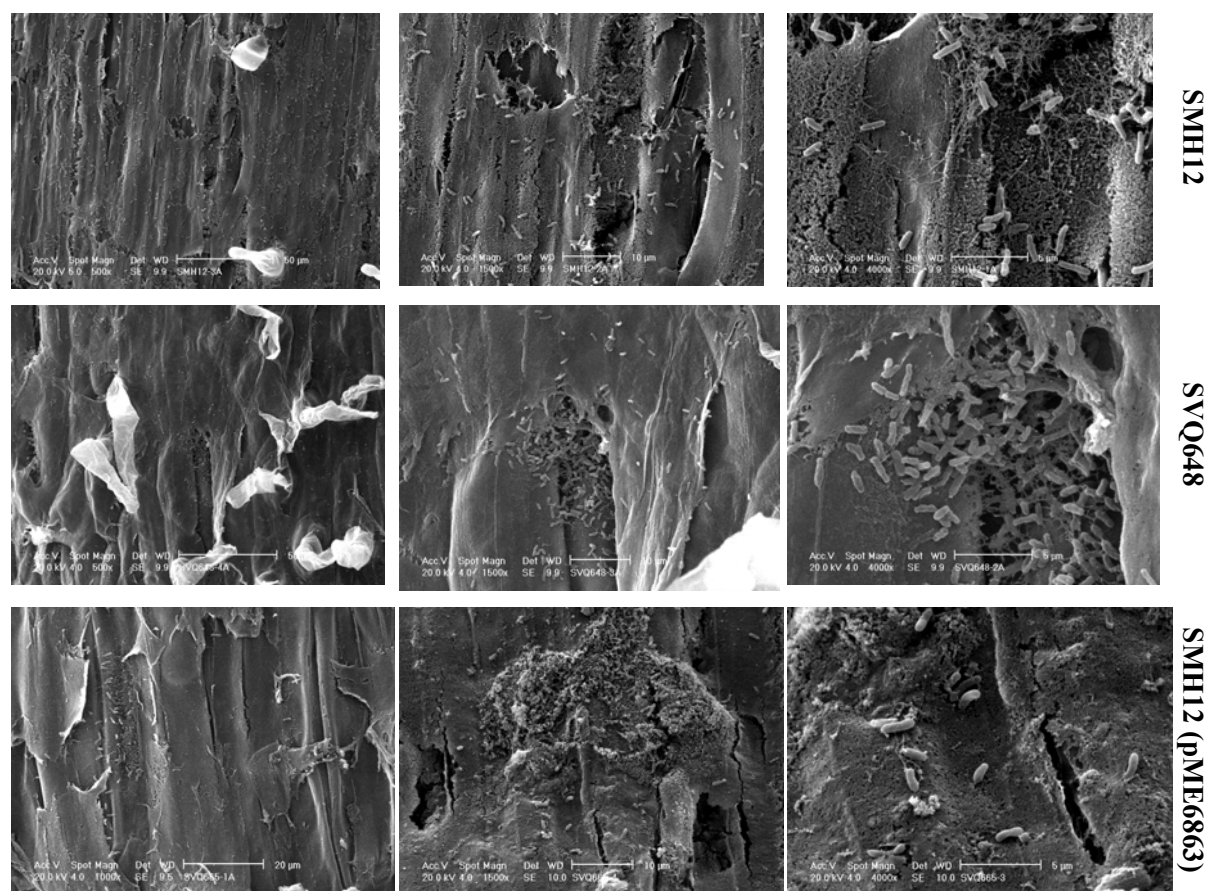


Figura 4.49. Visualización al microscopio electrónico de barrido de la colonización del ápice de la raíz de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios. Las imágenes mostradas corresponden a zonas representativas del ápice de la raíz con diferentes aumentos 7 días después de la inoculación con SMH12, SVQ648 y SMH12(pME6863).

4.3.8.- Curvas de crecimiento

Los sistemas de QS bacteriano dependen de la densidad celular, por lo tanto, para descartar que las diferencias observadas en los anteriores ensayos de nodulación, de formación de biofilm o de colonización de raíces se deban a diferencias en el crecimiento de las diferentes estirpes estudiadas, se realizaron curvas de crecimiento de SMH12 (Figura 4.51), SVQ646 (mutante *traI*) (Figura 4.51.A.), SVQ 648 (mutante *nodD1*) (Figura 4.51.B.) y SMH12 (pME6863), que expresa el gen de la lactonasa (Figura 4.51.C.), en medio YM(3).

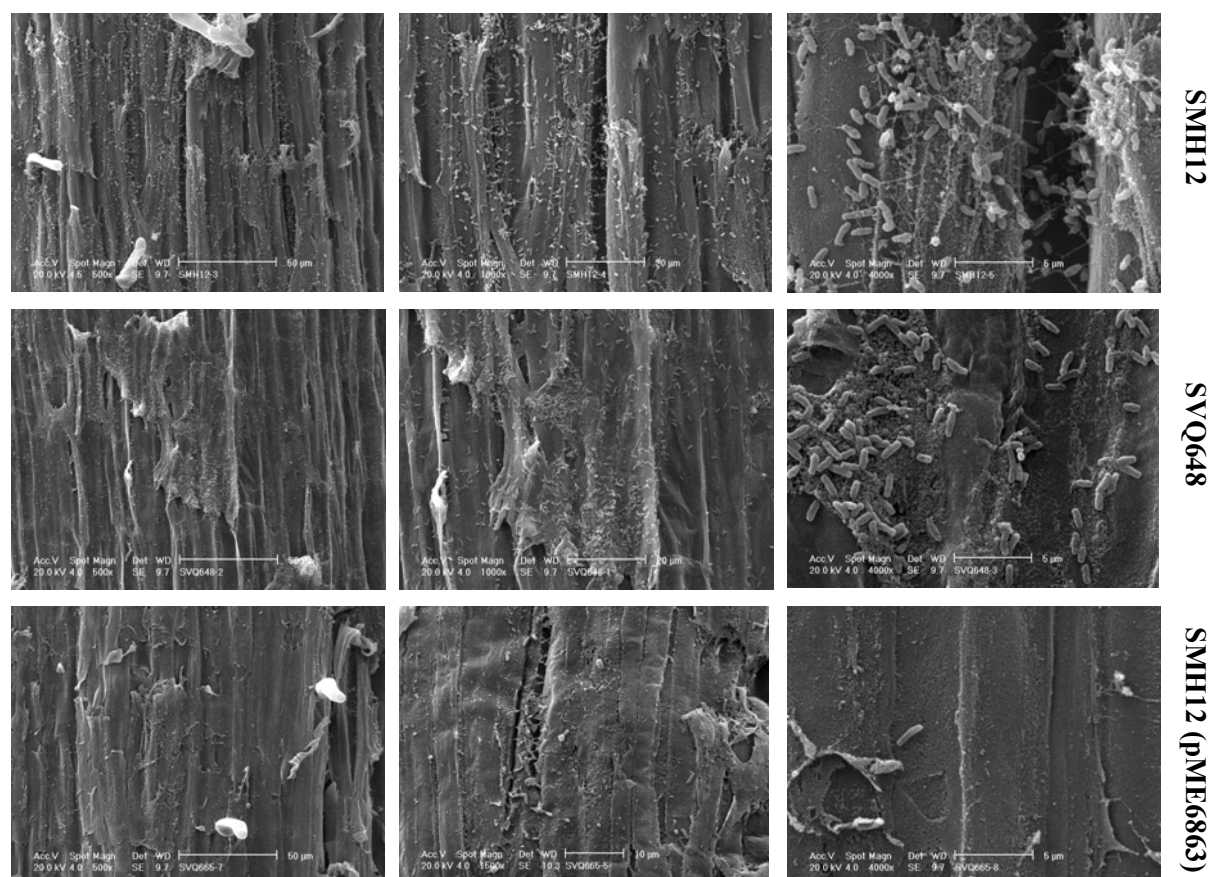


Figura 4.50. Imágenes al microscopio electrónico de barrido de la colonización de las raíces laterales de soja Osumi por diferentes estirpes de rizobios. Las imágenes mostradas corresponden a zonas representativas de las raíces laterales con diferentes aumentos 7 días después de la inoculación con SMH12, SVQ648 y SMH12(pME6863).

Los resultados indicaron que, en ninguna de las cuatro estirpes estudiadas, se apreciaron diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias (Figura 4.51.). Las cuatro estirpes mostraron en la fase estacionaria de crecimiento densidades ópticas a 600 nm en torno a 1. Esta fase se alcanzó aproximadamente a las 34 horas de cultivo en todas las estirpes estudiadas. En la anterior curva de crecimiento (Figura 4.34.A.), la estirpe SMH12 crecida con y sin flavonoide en medio YM(3) tardó aproximadamente 20 horas en alcanzar la fase estacionaria, con densidades ópticas a 600 nm en torno también a 1. Las diferencias observadas se deben al sistema de realización de la curva de crecimiento, ya que la primera de ellas (Figura 4.34.A) se realizó con tubos de cristal con tapón de rosca en 5 ml de medio, y la segunda de ellas (Figura 4.51.) se realizó en placas multipocillo en 200 µl de medio, por lo que la aireación en el primero de los experimentos fue muy superior.

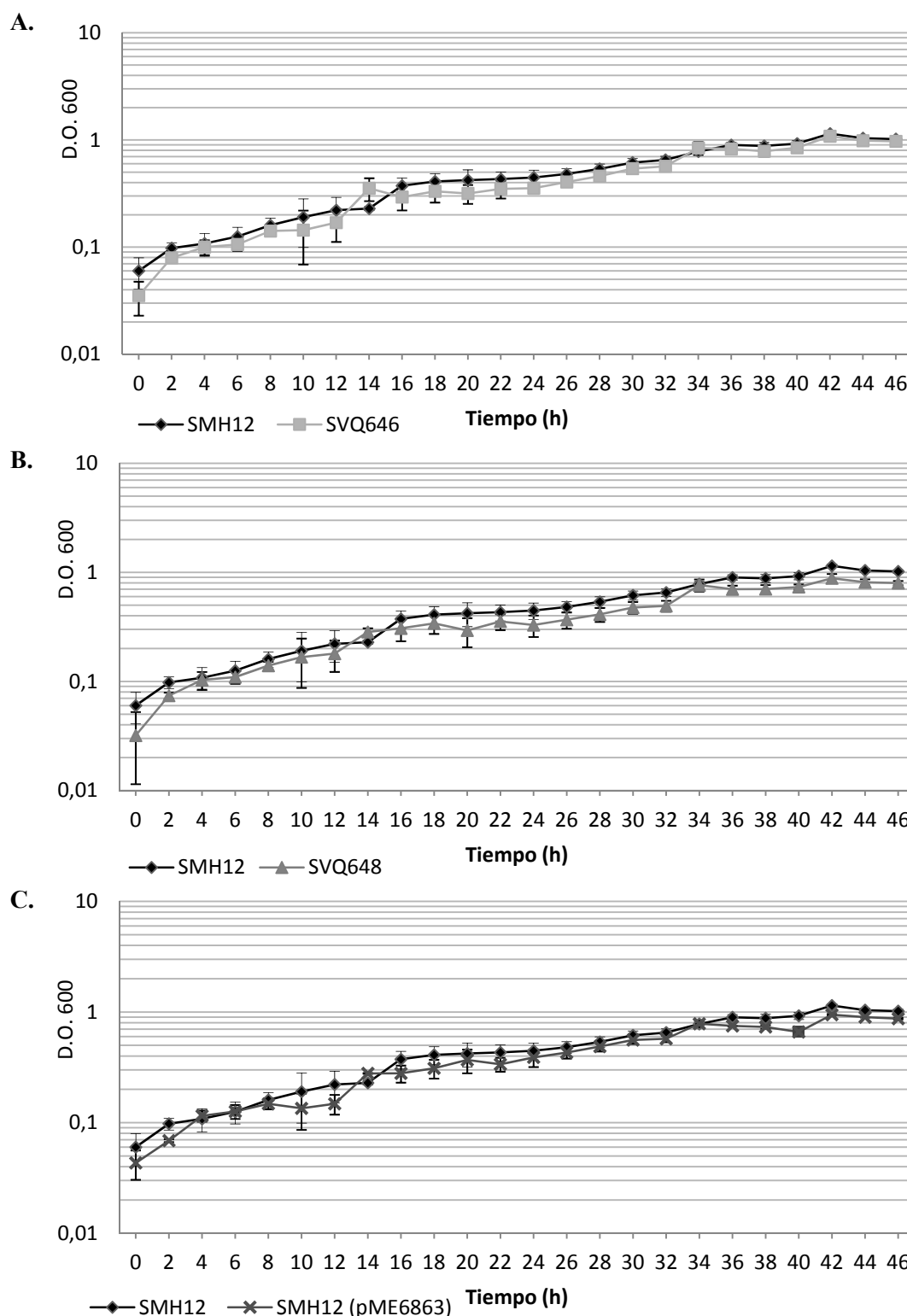


Figura 4.51. Curvas de crecimiento de SMH12 y derivados en medio YM(3). Las bacterias fueron crecidas en medio de cultivo YM(3). Los gráficos representan la media de 2 experimentos independientes con seis repeticiones cada uno (\pm desviación típica de la media). SMH12: rombo negro, SVQ646 (mutante *traI*): cuadrado gris, SVQ648 (mutante *nodDI*): triángulo gris; y SMH12 (pME6863): cruz gris.

La presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación no afectó al crecimiento en ninguna de las tres estirpes en estudio, por lo que podemos concluir que los flavonoides inducen los genes de síntesis de AI en *S. fredii* SMH12 y en *R. etli* ISP42 haciendo que aumente la producción de AI.

CAPÍTULO II:

ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA EN LOS SISTEMAS DE QUORUM SENSING

4.4.- Interferencia en los sistemas de QS bacteriano

En este último apartado de la Tesis, se estudió si plantas de *Oryza sativa* cv. Puntal y *Phaseolus vulgaris* cv. BBL contienen y/o producen moléculas que interfirieron con los sistemas de QS bacteriano. Además se realizaron estudios iniciales para la caracterización química de estas moléculas.

4.4.1.- Detección en plantas de arroz y judía de moléculas que interfieren en el QS bacteriano

4.4.1.1.- Ensayos con exudados de semilla, exudados de raíz y extractos de semilla

Los primeros experimentos realizados para detectar la presencia de moléculas que interfieren en el QS bacteriano (IQS) fueron llevados a cabo mediante ensayos de difusión en placa con diferentes estirpes biosensoras (*C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *E.coli* JM109 (pSB536)) a partir de exudados de raíces (ER) y semillas (ES) de *Oryza sativa* cv Puntal (A) y *Phaseolus vulgaris* cv BBL (J).

Los resultados (Figura 4.52.) mostraron que los exudados de raíz de arroz cv Puntal (ERA) contienen moléculas que inducen al biosensor *E.coli* JM109 (pSB536). En el caso de la judía cv BBL, fue el exudado de semilla (ESJ) el que indujo a los biosensores NT1 (pZRL4) y JM109 (pSB536). Con ninguno de los exudados de plantas de arroz o judía se obtuvieron resultados positivos de inducción del biosensor *Chromobacterium violaceum* CV026, ni en los ensayos directos, ni en los ensayos reversos, en los que se añadió C6-HSL al medio.

Para obtener una mayor concentración de moléculas que IQS se obtuvieron extractos de semillas (EX) de ambas plantas con metanol:agua (1:1 v/v). Tanto los EX de arroz como los EX de judía activaron a los biosensores NT1(pZRL4) y JM109 (pSB536), generando halos de mayor intensidad y diámetro a los que se producían con ESJ y ERA (Figura 4.53.).

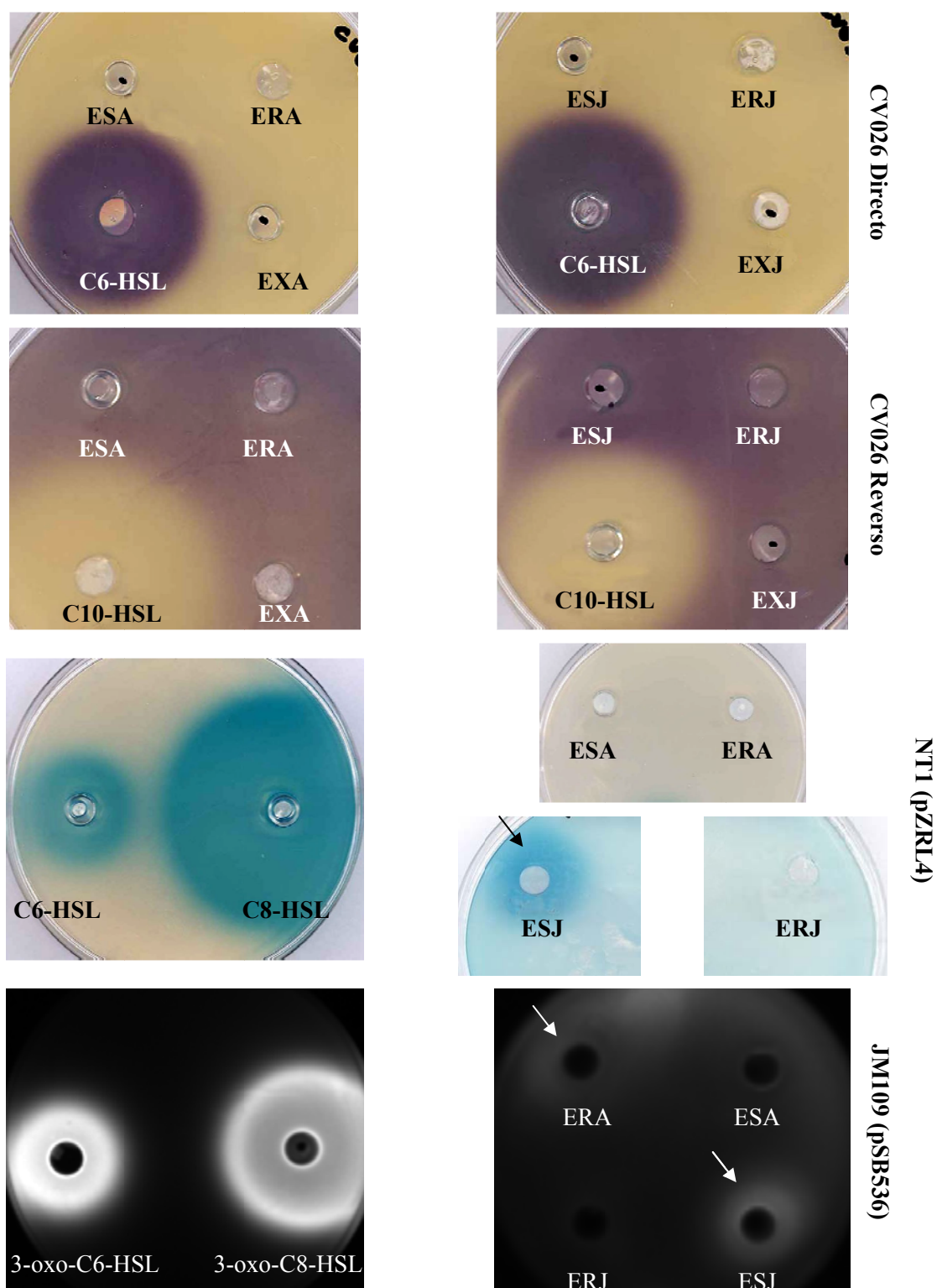


Figura 4.52. Ensayos de difusión en placa de exudados de semilla (ES) y exudados de raíz (ER) de plantas de arroz (A) cv Puntal y judía cv BBL (J). Usando al biosensor NT1(pZRL4) se detectaron moléculas que IQS (flechas) en ESJ. Con el biosensor JM109 (pSB536) se detectaron moléculas (flechas) que IQS en ERA y ESJ. No se detectaron moléculas que IQS con el biosensor CV026, ni en ensayos directos ni en ensayos reversos.

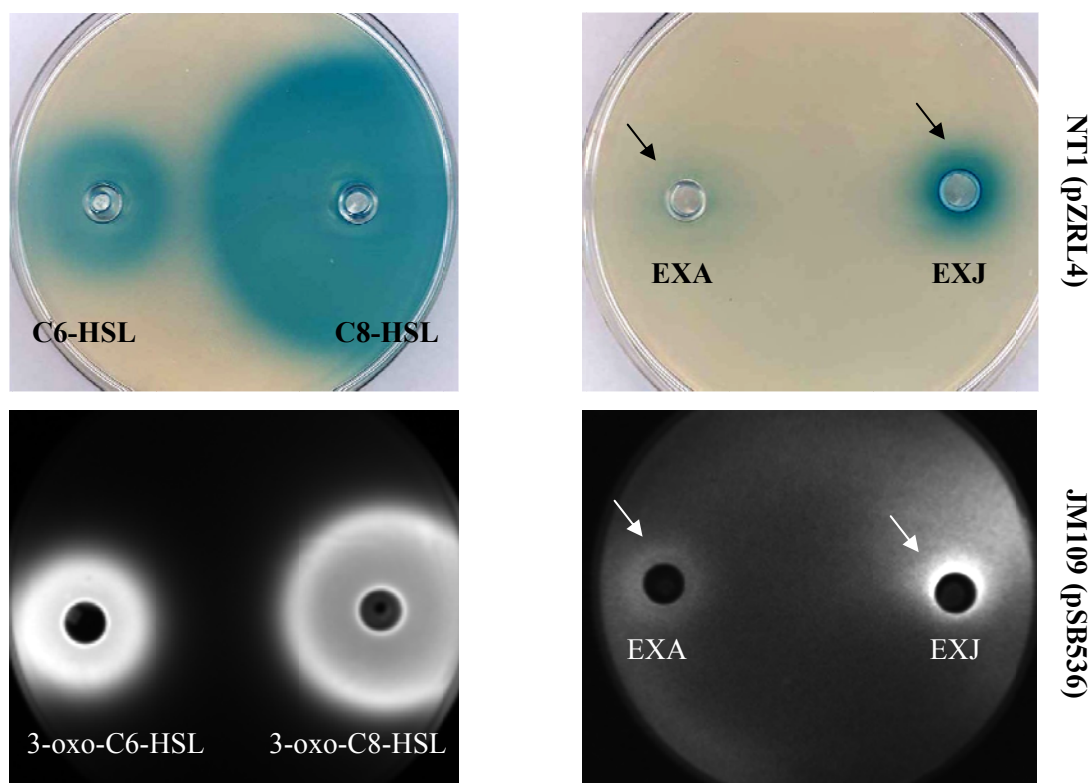


Figura 4.53. Ensayos de difusión en placa de extractos de semillas (EX) de plantas de arroz (A) cv. Puntal y judía cv. BBL (J). Usando al biosensor NT1(pZRL4) se detectaron moléculas que IQS (flechas) en EXJ y EXA. Con el biosensor JM109 (pSB536) se detectaron moléculas (flechas) que IQS en EXA y EXJ.

4.4.1.2.- Ensayos con raíces de plantas

Además de llevar a cabo ensayos de difusión en placa con ER, ES y EX en presencia de los diferentes biosensores, se hicieron ensayos en placa con raíces completas (Figura 4.54.). Para ello se tomaron raíces de plantas de arroz cv. Puntal y de judía cv. BBL que, tras crecer durante 7 días, se pusieron en contacto con los biosensores *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *E.coli* JM109 (pSB536). En el caso de CV026 se llevaron a cabo los dos tipos de ensayos, el directo, y el reverso, en el que se añade C6-HSL al medio.

Los resultados obtenidos mostraron que las raíces de *Oriza sativa* cv Puntal inducen a los biosensores NT1(pZRL4), JM109 (pSB536) y, en el caso del biosensor CV026 en ensayo reverso, se potencia la producción de violaceína en las zonas cercanas a la raíz.

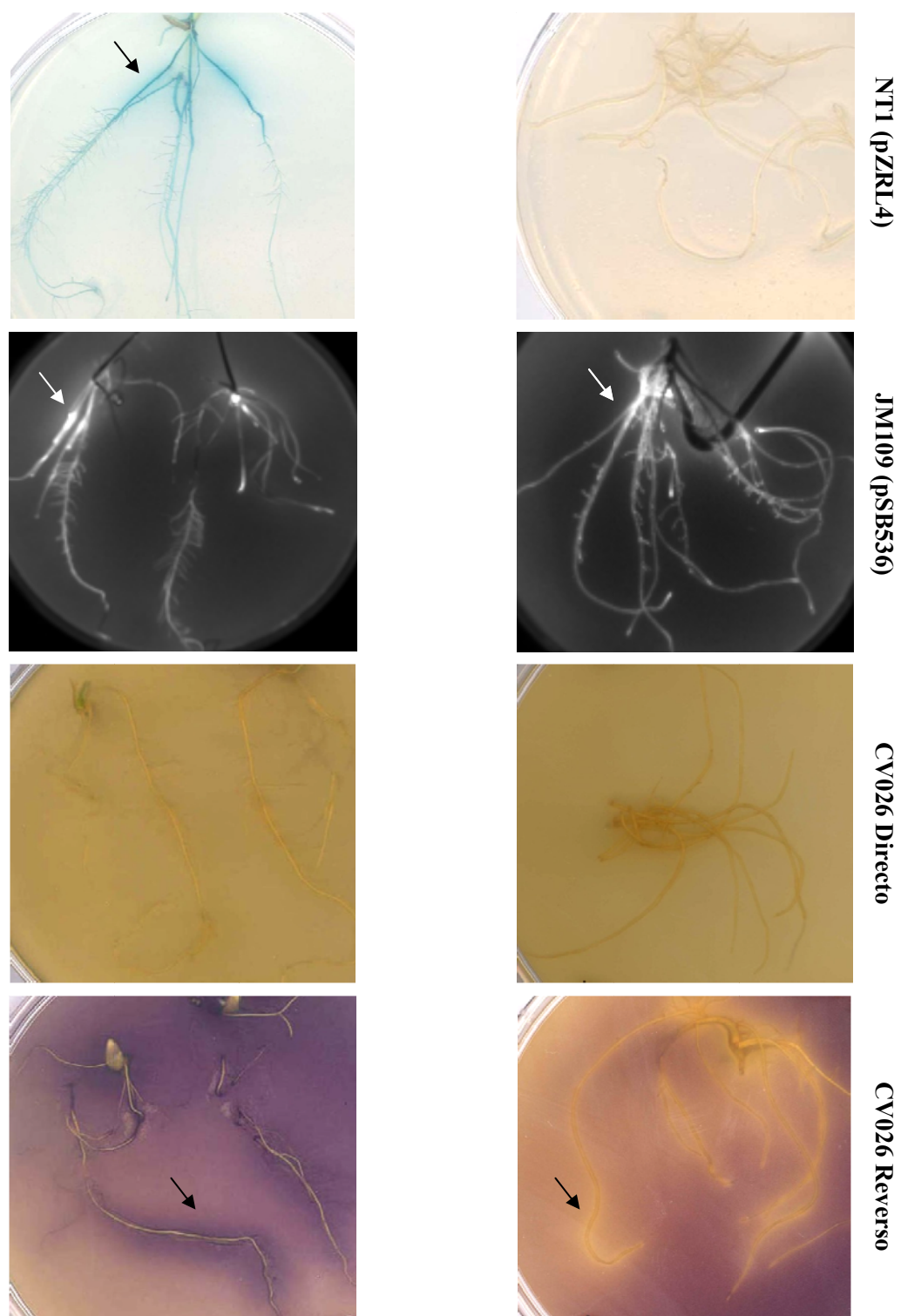


Figura 4.54. Ensayos en placa con raíces de plantas de arroz cv Puntal y de judía cv BBL en presencia de los diferentes biosensores. Con flechas están señaladas las zonas cercanas a las raíces de ambas plantas donde se aprecia una mayor inducción de los biosensores.

Las raíces de *Phaseolus vulgaris* cv BBL indujeron al biosensor JM109 (pSB536) e inhibieron la producción de violaceína en las zonas cercanas a la raíz en el ensayo reverso con CV026.

Todos estos resultados pusieron de manifiesto que tanto *Oryza sativa* cv Puntal como *Phaseolus vulgaris* cv BBL generan moléculas que IQS bacteriano. En arroz, se detectaron este tipo de moléculas, con al menos uno de los biosensores, en ER, EX y raíces (no en ES). En judía, sin embargo, no se detectaron moléculas que IQS en ER, pero si en ES, EX y raíces. En la Tabla 4.8. están resumidas las respuestas obtenidas en todos los experimentos de IQS.

Tabla 4.8. Respuestas de diferentes estirpes biosensoras a compuestos producidos por plantas de arroz y judía.

	<i>Oryza sativa</i> cv Puntal				<i>Phaseolus vulgaris</i> cv BBL			
	ES	ER	EX	R	ES	ER	EX	R
CV026 directo	0	0	0	0	0	0	0	0
CV026 reverso	0	0	0	+	0	0	0	-
NT1(pZLR4)	0	0	+	+	+	0	+	0
JM109 (pSB536)	0	+	+	+	+	0	+	+

ES: exudados de semilla. ER: exudados de raíz. EX: extractos de semilla. R: raíces

0: la estirpe biosensora no se afecta. +: en la estirpe biosensora se inducen los sistemas de QS. -: en la estirpe biosensora se inhiben los sistemas de QS.

Los bioensayos llevados a cabo indicaron que las plantas de arroz cv Puntal y judía cv BBL contienen moléculas que interfieren con los sistemas de QS de diversos biosensores bacterianos. En ambas plantas se encontraron este tipo de moléculas en los ensayos con raíces y con extractos de semilla. En el arroz, además, se encontraron en exudados de raíz y en judía en exudados de semilla.

4.4.2.- Determinación de las moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano

4.4.2.1.- Análisis mediante cromatografía en capa fina (TLC)

Para conocer las moléculas producidas por plantas de arroz cv Puntal y judía cv BBL que interfieren con los sistemas de QS, se llevaron a cabo cromatografías en capa fina (TLC) a partir de los EX de arroz y judía. Como estirpe biosensora se usó *A. tumefaciens* NT1(pZRL4). Los resultados (Figura 4.55.) mostraron que ambas plantas contienen al menos una molécula que induce al biosensor. En ambas plantas, la migración de la molécula tras la cromatografía fue prácticamente nula, si bien la intensidad de la inducción del biosensor fue mayor en las muestras de EXJ que en las de EXA.

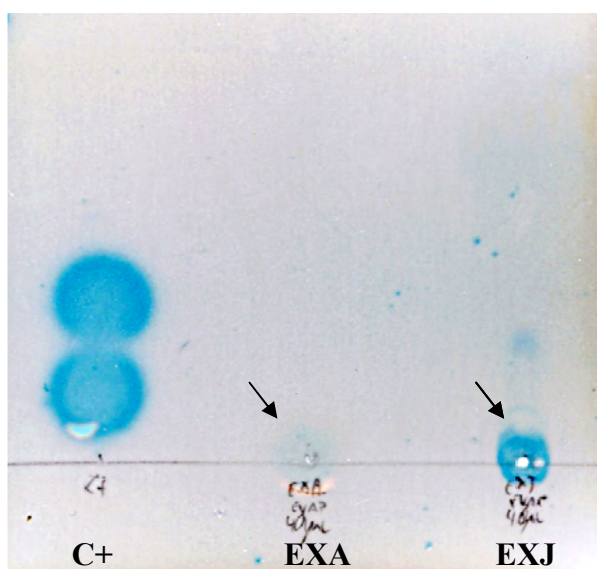


Figura 4.55. Separación mediante TLC y revelado de moléculas que IQS. Se cargaron extractos de semilla de Arroz cv Puntal (EXA), extractos de semilla de Judía cv BBL (EXJ). C+: C8-HSL (inferior) y C6-HSL (superior). Como estirpe biosensora se utilizó *A. tumefaciens* NT1(pZRL4). Se utilizaron cromatoplasas de fase reversa C₁₈ y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Con flechas están indicados los spots correspondientes a las moléculas que IQS.

Los ensayos realizados indicaron que al menos existe una molécula en los extractos de semilla de ambas plantas capaz de inducir al biosensor NT1 (pZRL4).

4.4.3.- Caracterización química de las moléculas que interfieren con los sistemas de QS bacteriano

4.4.3.1.- Influencia del pH

Una vez detectada la presencia de al menos una molécula capaz de interferir en el QS bacteriano producida por las plantas de arroz cv Puntal y de judía cv BBL, el siguiente paso en el estudio de la IQS fue la caracterización química. Para la detección de moléculas que IQS se usaron tres estirpes biosensoras, capaces de detectar moléculas AI de tipo AHL. Las moléculas que IQS producidas por eucariotas descritas hasta la fecha no son de tipo AHL y, sin embargo, inducen a algunos biosensores de este tipo (Gonzalez y Keshavan, 2006). Así pues, son necesarias una serie de comprobaciones para caracterizar químicamente estas moléculas y descartar que su naturaleza química sea de tipo AHL. Según Yates *et al.* (2002) la degradación de las AHL se produce a pH alcalino y a temperatura alta (a partir de 37 °C). Por ello, se repitieron los ensayos de difusión en placa tras someter a tratamientos alcalinos (pH 9,5) las muestras de EXA y EXJ que previamente habían mostrado actividad inductora del biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4). Los resultados para los extractos de semilla de ambas plantas indicaron que el pH alcalino al que fueron sometidos provocaba una pérdida de actividad biológica con el biosensor (Figura 4.56.). Los respectivos estándares (C6-HSL) sometidos al mismo tratamiento mostraron también la pérdida de actividad.

4.4.3.2.- Ensayos con biosensores que expresan la enzima lactonasa

Esta pérdida de actividad inductora de las moléculas que IQS a pH alcalino no permitió descartar a estas moléculas como AHL. Por lo tanto, fue necesaria la construcción de biosensores basados en *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) y *E.coli* JM109 (pSB536) incapaces de detectar moléculas de tipo AHL y repetir los ensayos llevados a cabo previamente con estos nuevos biosensores.

Para ello, en primer lugar, se introdujo el plásmido pME6863 (Reimmann *et al.* 2002), que porta el gen que codifica la enzima lactonasa (gen *aiiA* de *Bacillus* sp.), a ambos biosensores. Se comprobó (Figura 4.57.) que la sensibilidad ante las AHL patrones disminuía drásticamente o incluso desaparecía. Se repitieron los ensayos de

difusión en placa a partir de extractos de semilla de ambas plantas usando los biosensores *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863). Los resultados demostraron que mientras el biosensor con la lactonasa dejaba de ser inducido con las AHL patrón, las muestras de EXA y EXJ seguían induciéndolo.

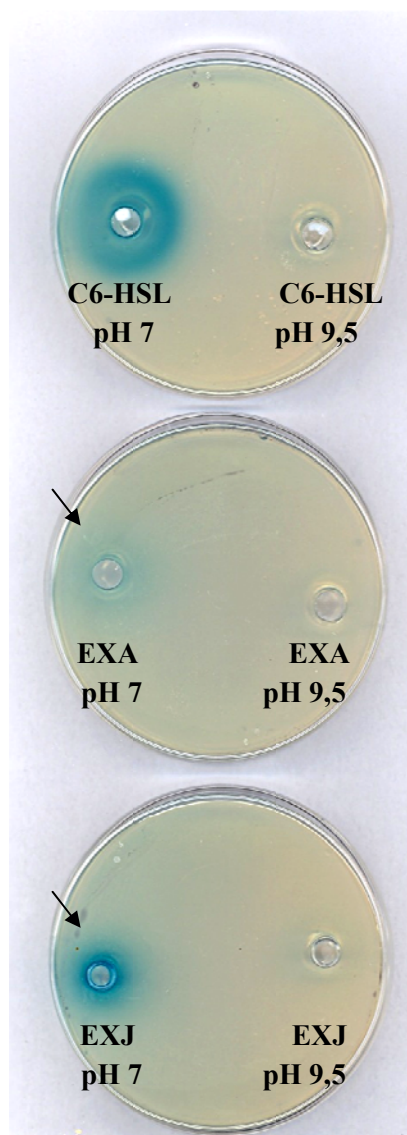


Figura 4.56. Ensayos de difusión en placa de EX de plantas de arroz cv Puntal y judía cv BBL tras tratamiento alcalino. Se usó a *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) como estirpe biosensora. El tratamiento a pH 7 consistió en añadir en el pocillo EX:Agua (1:1 vol/vol). El tratamiento alcalino consistió añadir en el pocillo EX: Tris-HCl 1M pH 9,5 (1:1 vol/vol). C+: C6-HSL. Las muestras ensayadas son extractos de semilla (EX) de arroz (A) y judía (J). Con flechas están indicados los pocillos en los que se indujo al biosensor.

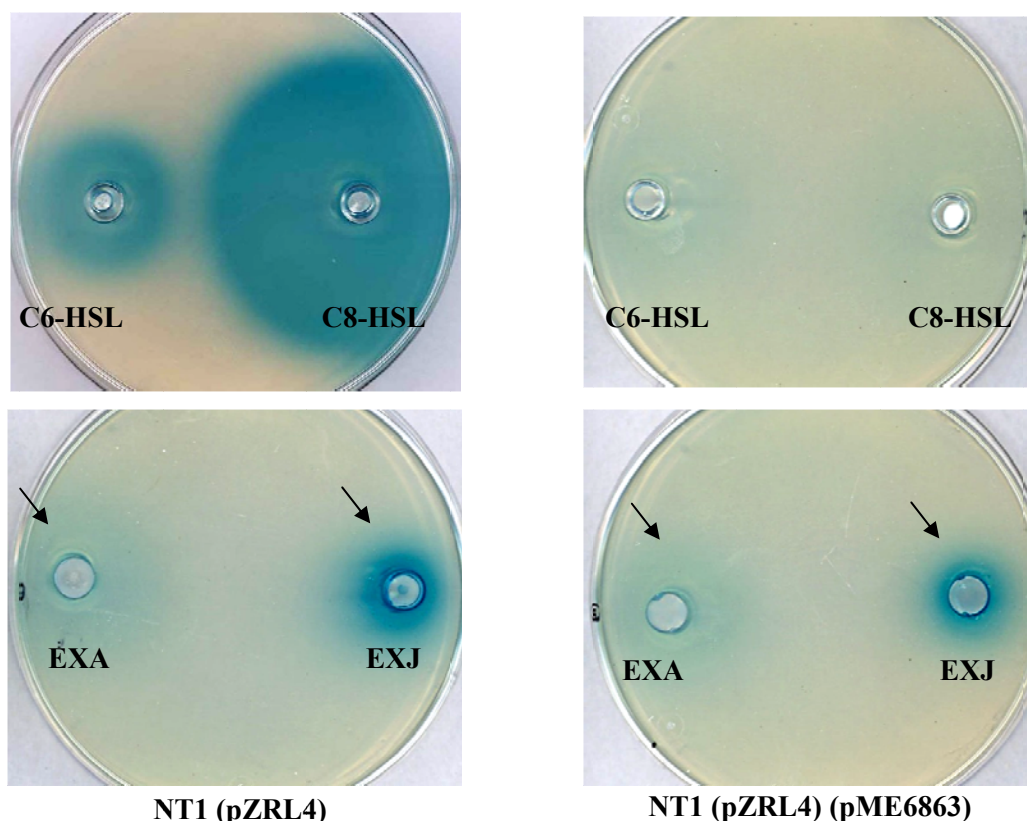


Figura 4.57. Ensayos de difusión en placa con biosensores portadores del gen de la lactonasa. Se usaron como estirpes biosensoras *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) (Izquierda) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) (Derecha). Las muestras ensayadas son extractos de semilla (EX) de arroz (A) y judía (J). Con flechas están indicados los pocillos en los que se indujo al biosensor.

Además de los ensayos de difusión en placa, se repitieron los ensayos en placa con raíces completas usando a los biosensores bioluminiscentes *E. coli* JM109(pSB536) y *E. coli* JM109(pSB536)(pME6863). Los resultados (Figura 4.58.) mostraron que tanto en raíces de judía cv BBL como en raíces de arroz cv Puntal la presencia de la enzima lactonasa en el biosensor no afectó la producción de bioluminiscencia en las zonas cercanas a la raíz. Por lo tanto los resultados a partir de EX como los obtenidos con raíces de ambas plantas indicaron que la naturaleza química de las moléculas que IQS producidas por *Phaseolus vulgaris* cv BBL y *Oryza sativa* cv Puntal no es de tipo AHL.

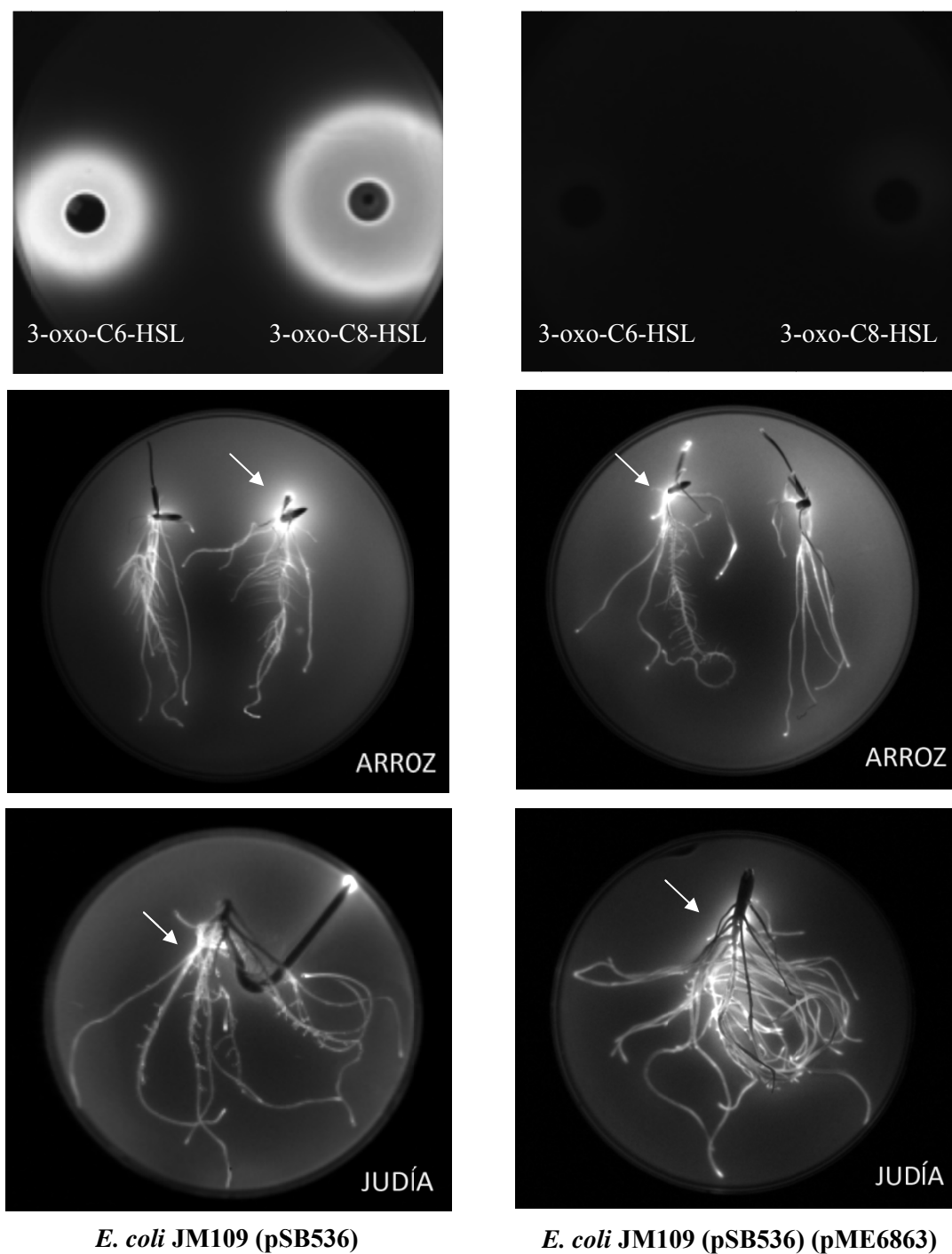


Figura 4.58. Ensayos en placa con raíces de plantas de arroz cv Puntal y judía cv BBL en presencia de biosensores expresando la enzima lactonasa. Con flechas están señaladas las zonas cercanas a las raíces de ambas plantas donde se aprecia una mayor inducción de los biosensores.

4.4.3.3.- Análisis mediante cromatografía en capa fina y revelado con biosensores portadores del gen de la lactonasa

Además de los ensayos de detección en placas de Petri con los extractos de semilla de ambas plantas, se repitió la separación mediante cromatografía en capa fina (TLC) para, posteriormente, revelarlas con los biosensores *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1(pZRL4)(pME6863). Los resultados mostraron que los patrones cargados como controles (C8-HSL y C6-HSL) sufrían una reducción en el diámetro del mancha pasando de 15 mm en la C8-HSL y 13 mm en la C6-HSL a 5 mm y 7 mm respectivamente cuando se usaba el biosensor con el gen que codifica la enzima lactonasa. Sin embargo, los diámetros de las manchas de los extractos de semillas de arroz y judía no sufrieron esa reducción, si bien en el caso del arroz se redujo la intensidad del spot (Figura 4.59.). Estos resultados indicarían de nuevo que las moléculas producidas por plantas de arroz y de judía que interfieren en el QS bacteriano no son de tipo AHL.

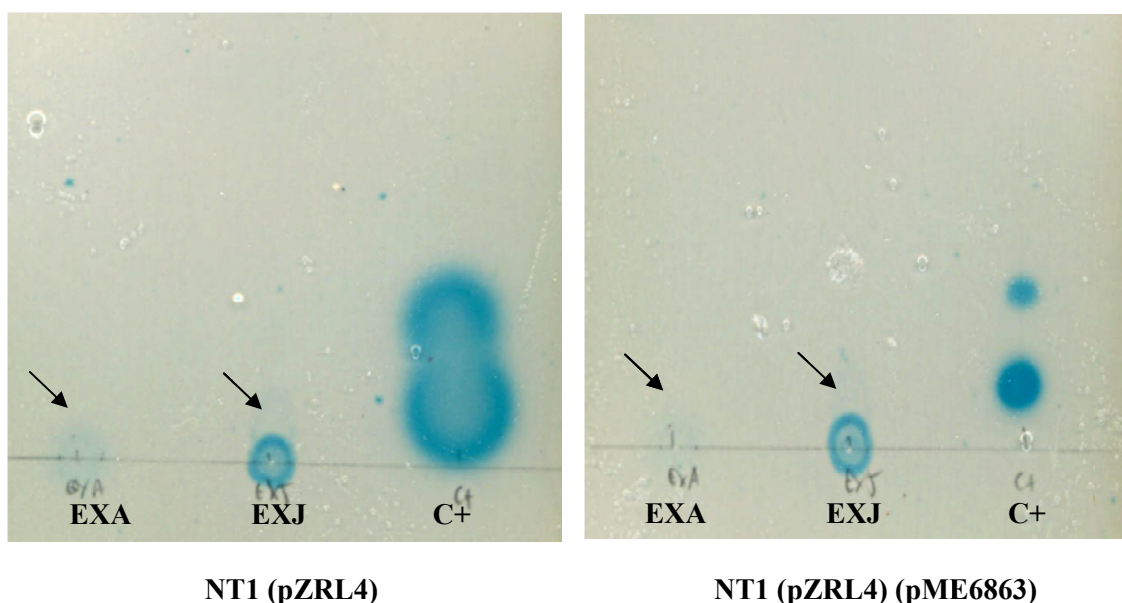


Figura 4.59. Separación y revelado de moléculas que IQS. Se cargaron extractos de semilla de arroz cv. Puntal (EXA) y judía cv. BBL (EXJ). Se utilizaron cromatoplasmas de fase reversa C₁₈ y una mezcla metanol:agua (60:40 v/v) como fase móvil. Como controles se usaron las AHL comerciales C8-HSL (inferior) y C6-HSL (superior). Como estirpes biosensoras se usaron *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) (pME6863). Con flechas están indicadas las manchas correspondientes a las moléculas que IQS.

Las pruebas realizadas demuestran que las moléculas que interfieren en los sistemas de QS producidas por arroz y judía no se degradan en presencia de la enzima lactonasa, por lo que su naturaleza química es diferente a la de las AHL.

4.4.3.4.- Análisis mediante HPLC y ensayo biológico con el biosensor portador del gen de la lactonasa de las fracciones obtenidas de los extractos de semillas de plantas

Por último, y en colaboración con el Profesor Gil Serrano, del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química, se llevó a cabo un fraccionamiento de los extractos de semilla de ambas plantas mediante el paso y posterior elución de las muestras con diferentes porcentajes de metanol a través de cartuchos SPE-C18. Para ambos extractos se obtuvieron 7 fracciones, correspondientes a la elución inicial del extracto a través del cartucho que se tomará como control positivo de actividad (fracción A), y a las correspondientes al paso de metanol 50% (fracción B), metanol 60% (fracción C), metanol 70% (fracción D), metanol 80% (fracción E), metanol 90% (fracción F) y metanol 100% (fracción G). Este fraccionamiento permite separar, en el caso de que haya más de una, las diferentes moléculas que interfieren en los sistemas de QS según su afinidad por los eluyentes, así como determinar si la naturaleza de estas moléculas es de tipo AHL, mediante inducción con biosensores que expresen o no la enzima lactonasa, en ensayos microtítulo de las fracciones.

Los ensayos de inducción en placas microtítulo con los biosensores *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) mostraron (Figura 4.60. y Figura 4.63.) que en extractos de semilla de arroz, las fracciones A, B, C, F y G inducían al biosensor NT1 (pZRL4). Sin embargo, únicamente las fracciones A, B y C inducían al biosensor NT1 (pZRL4) (pME6863). Esto parece indicar que las moléculas presentes en las 3 primeras fracciones no son de tipo AHL, puesto que no son degradadas por la enzima lactonasa. Las moléculas que interfieren en el QS del biosensor que aparecen en las dos últimas fracciones, sin embargo, sí que son degradadas por la enzima lactonasa, por lo que probablemente su naturaleza química sea similar o idéntica a las de las AHL.

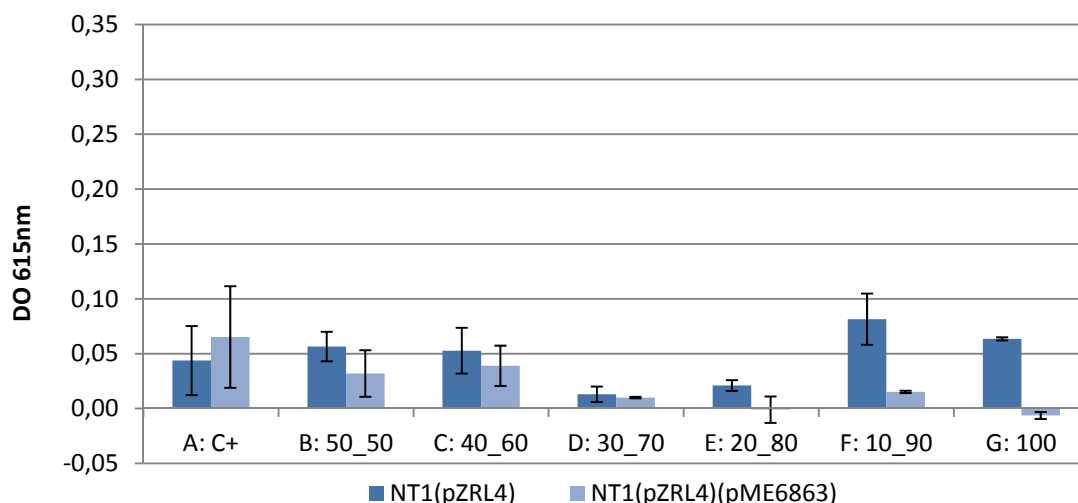


Figura 4.60. Ensayos de inducción de *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) con fracciones de extractos de semillas de arroz. Se midió la inducción de ambos biosensores en presencia de fracciones (A-G) obtenidas a partir de los extractos de semilla de arroz cv. Puntal mediante un lector de placas micrótítulo con una absorbancia de 615 nm. Los datos representados corresponden a la media de 2 experimentos independientes con dos repeticiones.

En el caso de los ensayos con las fracciones procedentes de semilla de judía (Figura 4.61. y Figura 4.63.), únicamente en las fracciones A y B se aprecia claramente inducción de ambos biosensores. Esto indica, que las moléculas que interfieren en los sistemas de QS presentes en la judía no son de tipo AHL. Cabe resaltar que, al igual que en los ensayos de difusión en placa y las TLC, los niveles de inducción del biosensor detectados en las fracciones procedentes de los extractos de semillas de judía cv. BBL son entre 3 y cuatro veces mayores que las de los extractos de semillas de arroz cv. Puntal, debido a que se consiguió mayor extracto seco durante su obtención.

Como control se realizó una curva con el patrón 3-oxo-C6-HSL a concentraciones entre 1 y 100 ng/μl con ambos biosensores. Se constató que el biosensor con el gen de la lactonasa, efectivamente, no detectó a este patrón a las concentraciones del ensayo. En el caso del biosensor NT1 (pZRL4) sí que se observa una inducción en presencia de la AHL, y ésta es proporcional a la concentración de la 3-oxo-C6-HSL hasta llegar a la saturación a partir de los 30 ng/ml (Figura 4.62. y Figura 4.63.).

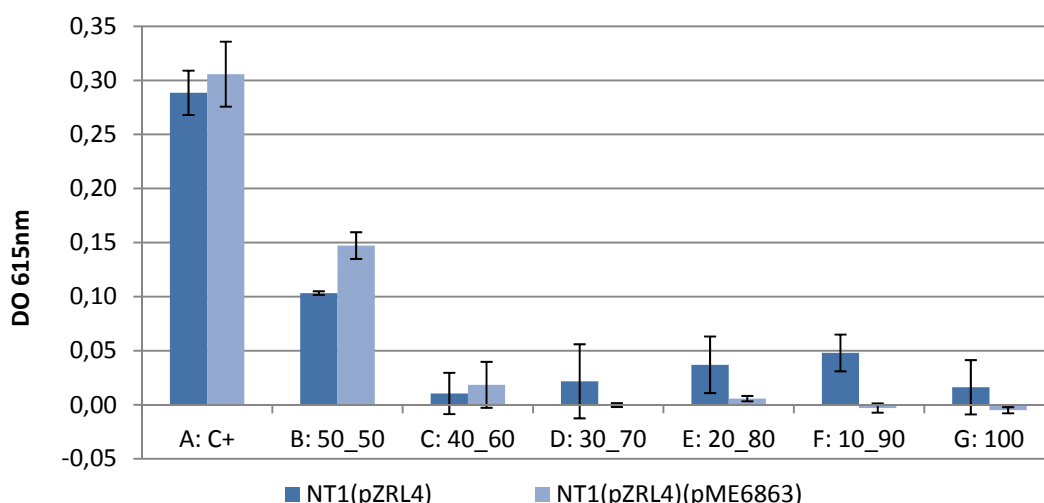


Figura 4.61. Ensayos de inducción de *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) con fracciones de extractos de semillas de judía. Se midió la inducción de ambos biosensores en presencia de fracciones (A-G) obtenidas a partir de los extractos de semilla de judía cv. BBL mediante un lector de placas micrótítulo con una absorbancia de 615 nm. Los datos representados corresponden a la media de 2 experimentos independientes con dos repeticiones.

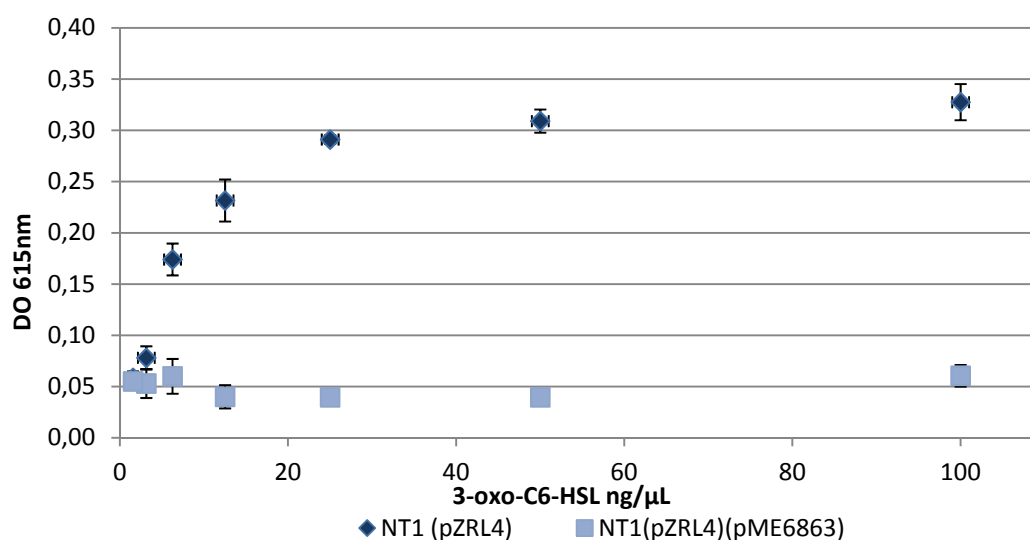


Figura 4.62. Ensayos de inducción de *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) con diferentes concentraciones del patrón. Se midió la inducción de ambos biosensores en presencia de diferentes concentraciones del patrón 3-oxo-C6-HSL mediante un lector de placas micrótítulo con una absorbancia de 615 nm. Los datos representados corresponden a la media de dos experimentos independientes con dos repeticiones cada uno.

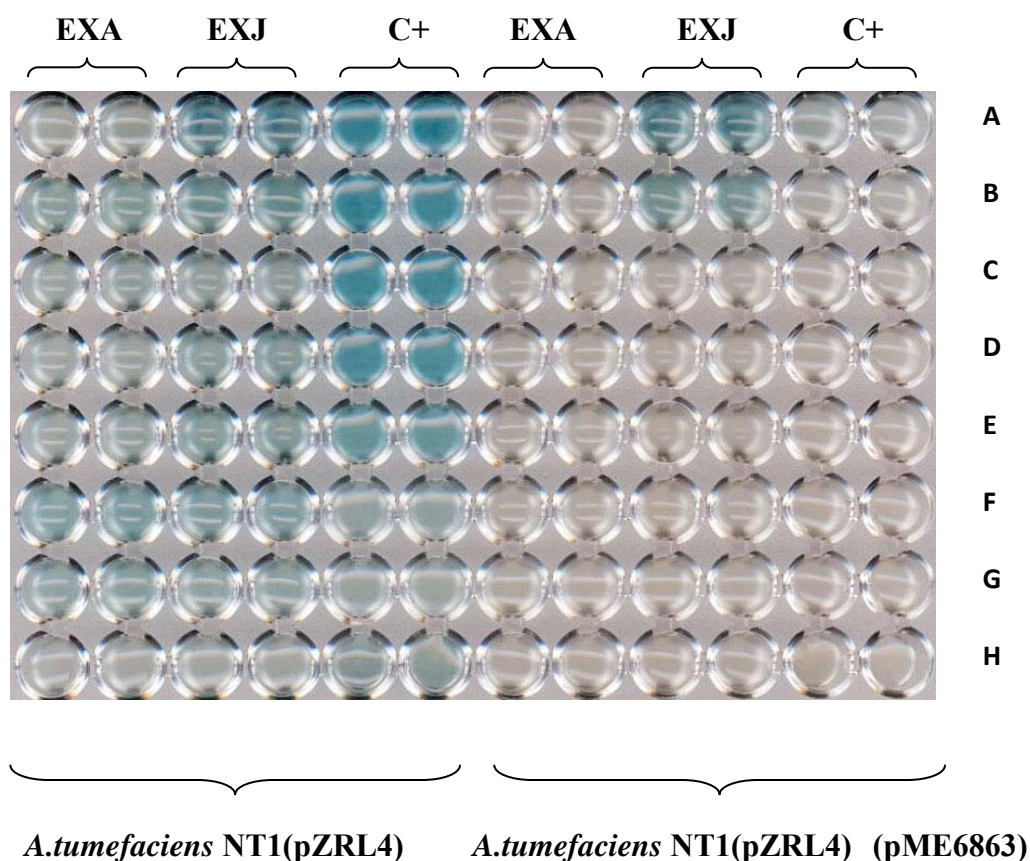


Figura 4.63. Ensayos de inducción de *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) en placas microtítulo. Las fracciones A, B, C, D, E, F y G obtenidas a partir de extractos de semilla de arroz (EXA) y judía (EXJ) se ensayaron por duplicado en cada biosensor. Como controles, se usó un patrón de AHL comercial (3-oxo-C6-HSL) a concentraciones decrecientes del mismo (C+).

4.4.3.5.- Análisis estructural de las moléculas que interfieren en los sistemas de QS

El análisis estructural de las moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano se llevó a cabo mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas, buscándose únicamente moléculas de tipo AHL. Para estos experimentos se tomaron las fracciones A y B procedentes de los extractos de judía, ya que en estos extractos se apreció una alta inducción en el ensayo con los biosensores *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y su derivado que expresa el gen de la enzima lactonasa. El extracto seco de cada una de estas dos fracciones se disolvió en 1 ml de metanol:agua:ácido fórmico

(50:50:0,1, v/v/v) y se analizó por HPLC-MS/MS. Finalmente, y como cabía esperar, no se detectaron moléculas de tipo AHL en ninguna de las dos fracciones analizadas.

Tanto en los extractos de semilla de arroz como en los de judía existen moléculas que interfieren en los sistemas de QS que no son de tipo AHL. En el caso de los extractos de arroz, es posible que exista una segunda molécula inductora, pero su naturaleza química deber ser similar a la de las AHL, puesto que se degrada en presencia de lactonasa.

DISCUSIÓN

Como se ha comentado anteriormente, el establecimiento de una simbiosis efectiva entre los rizobios y las leguminosas requiere el intercambio de una serie de señales moleculares entre ambos organismos. En esta Tesis se han estudiado los sistemas de QS de tres estirpes de rizobios, así como la interferencia que las plantas de arroz y judía pueden tener con los sistemas de QS bacteriano.

La comunicación celular en los rizobios se describió por primera vez en *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* en 1992 por Cubo *et al.* Desde entonces, se han descubierto sistemas de QS en la mayoría de los rizobios en los que se ha estudiado (Tabla 1.5.) y, en general, en la mayoría de las bacterias que establecen relaciones con eucariotas, tanto de tipo patógeno, como de tipo simbiote, que coordinan y regulan muchos de los procesos de interacción con el hospedador mediante sistemas de QS (Soto *et al.*, 2006).

En este trabajo, se eligieron para el estudio de los sistemas de QS y su implicación en la interacción con las leguminosas tres rizobios con rangos de nodulación muy diferentes: *Sinorhizobium fredii* SMH12, que es un rizobio con amplio rango de hospedador capaz de nodular en decenas de leguminosas, entre las que se encuentra la soja; *Rhizobium etli* ISP42, que nodula en varias leguminosas aunque, especialmente, en diferentes variedades de judía y *Rhizobium sullae* IS123 que, hasta la fecha, sólo se ha demostrado que nodula en la leguminosa *Hedysarum coronarium*.

Lo primero que se comprobó fue que, efectivamente, estos tres rizobios producen AI en función de la densidad celular. Se eligió a un biosensor con alta sensibilidad y amplio rango de detección de AI, *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (Holden *et al.*, 1999) y se determinó mediante ensayos de difusión en placa que las tres bacterias eran productoras de moléculas detectables por el biosensor y que éstas se acumularon a mayor concentración cuando se empleó el medio YM(3), tras seis días de cultivo (Figura 4.1). En esta misma figura se observa que cuando se comparan los diámetros de los halos de inducción en los ensayos de difusión en placa SMH12 es la estirpe que más induce al biosensor, seguida de ISP42 y, por último, IS123. La mayor inducción del biosensor puede deberse a una mayor concentración de los AI en el sobrenadante, pero también al tipo de AI que se produce, ya que cada biosensor tiene afinidades diferentes por cada tipo de AI (McClellan *et al.*, 1997; Farrand *et al.*, 2002; Swift *et al.*, 1997).

La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica que permite la separación de los AI en función de su tamaño y polaridad, encontrándose las moléculas más pequeñas y

polares en la parte superior de la cromatoplaça, ya que presentan mayor migración. Esto se traduce en que los AI de tipo AHL con menor número de carbonos en la cadena lateral y con sustituyentes en el carbono 3 en esa misma cadena, ya sea de tipo oxo- o hidroxi- migran más que las AHL con cadena lateral larga y sin sustituyente en el carbono 3 de la misma (Figura 4.1.D y E). El hecho de que SMH12 sea el mayor inductor del biosensor en ensayos de difusión en placa y IS123 el que menos induce, queda también demostrado por los resultados obtenidos mediante TLC (Figura 4.2.): SMH12 es la bacteria que produce un mayor número de moléculas AI y en mayor concentración, al menos cuatro, ISP42 al menos 3, y IS123, la que menos produce, al menos dos. Estas dos últimas estirpes, además, las producen en menor concentración (Figura 4.2.).

Para conocer la naturaleza y estructura química de las moléculas producidas por las tres estirpes de rizobios se realizaron dos tipos de análisis. En primer lugar, los extractos de los sobrenadantes de las tres bacterias fueron analizados mediante HPLC acoplada a espectrometría de masas en tándem mediante la técnica “multiple reaction monitoring” (MRM) en colaboración con el grupo del Profesor Gil Serrano del Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla y, posteriormente, se usó un segundo método complementario, el ion precursor, para identificar las moléculas no detectadas mediante MRM. Finalmente se verificaron las AHL detectadas mediante comparación de espectros de masas de estándares mediante la técnica EPI. Estos estudios revelaron que *S. fredii* SMH12 producía la C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL (Figura 4.3., Figura 4.4. y Figura 4.5.), *R. etli* ISP42 la C8-HSL, la 3-OH-C8-HSL y 3-oxo-C14-HSL (Figura 4.6., Figura 4.7., Figura 4.8. y Figura 4.9.); y *R. sultae* la C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL y la 3-OH-C8-HSL (Figura 4.10., Figura 4.11., Figura 4.12. y Figura 4.13.). En segundo lugar, para comprobar estos resultados y para conocer si se producían más moléculas cuya naturaleza no fuese de carácter AHL, se analizaron los extractos de los sobrenadantes de las bacterias mediante fraccionamiento con HPLC y estudio de la capacidad inductora de las diferentes fracciones sobre el biosensor NT1 (pZRL4) y se compararon con los resultados obtenidos en los análisis mediante TLC y en los diferentes análisis de espectrometría de masas. Según esos resultados, tanto los ensayos de inducción de las fracciones obtenidas de la HPLC (Figura 4.14.), como los resultados obtenidos mediante TLC (Figura 4.2.) indicaron que SMH12 produce al menos 4 moléculas con capacidad autoinductora. Los tiempos de

retención hallados para los patrones (Tabla 4.2.) indican que la fracción 8 correspondería a la 3-oxo-C8-HSL y la fracción 12 a la C8-HSL en los ensayos de inducción con las fracciones sobre el biosensor *A. tumefaciens* NT (pZRL4) en placas multipocillo (Figura 4.14.A). Sin embargo, existen otras dos fracciones, la 5 y la 15, que indujeron al biosensor. Éstas, según los tiempos de retención de los patrones (Tabla 4.2.) se corresponderían con la 3-oxo-C6-HSL y la C14-HSL, respectivamente. En las TLC, las manchas con movilidad intermedia deben corresponder, por lo tanto, a la C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL (Figura 4.2.A). La mancha que presenta mayor migración en la cromatoplaça, que se debe corresponder con la fracción 5 de los ensayos de inducción, tiene la misma movilidad que el patrón 3-oxo-C6-HSL (Figura 4.2.E). La que presenta menor migración, correspondiente con la fracción 15, posee menor movilidad que el patrón C10-HSL (Figura 4.2.D). Todo esto hace pensar que, probablemente, SMH12 produzca, además de la C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL, una AHL de cadena corta (presumiblemente la 3-oxo-C6-HSL) y una AHL de cadena larga. El hecho de que no se hayan identificado mediante espectrometría de masas no quiere decir que no estén presentes o que no sean de tipo AHL, sino que puede que la concentración de estas moléculas no alcance el límite de detección del método espectrométrico empleado en nuestro estudio.

En el caso de *R. etli* ISP42, la espectrometría de masas identificó las 3 manchas detectadas mediante TLC (Figura 4.2.B): la C8-HSL, correspondiente a la mancha intermedia; la 3-OH-C8-HSL, que debe corresponder a la mancha con movilidad superior; y la 3-oxo-C14-HSL, que es la mancha con menor migración en la cromatoplaça. Los ensayos de inducción con las fracciones obtenidas por HPLC confirmaron esta observación, ya que las fracciones 7, 12 y 16 mostraron inducción (Figura 4.14.B), que corresponden a las fracciones de elución de los patrones 3-OH-C8-HSL, C8-HSL y 3-oxo-C14-HSL, respectivamente.

Por último, en el caso de *R. sultae* IS123, se identificaron mediante espectrometría de masas la C8-HSL, la 3-OH-C8-HSL, y la 3-oxo-C8-HSL. En los ensayos de inducción con las fracciones obtenidas mediante HPLC, las fracciones 7 y 12 generaron valores altos de actividad, lo que se correspondería con las AHL identificadas mediante espectrometría de masas antes mencionada (Figura 4.14.C). Aparece, además, en la fracción 5, un alto nivel de inducción del biosensor, por lo que IS123 podría sintetizar otra AHL. Esta fracción se correspondería con la elución de la 3-oxo-C6-HSL (Tabla

4.2.). En la TLC se identificaron al menos 2 manchas; la que presenta menor movilidad, se corresponde con la C8-HSL, y la de mayor, con una mezcla de las otras dos AHL (Figura 4.2.C). Esto se debe a que las AHL con sustituyentes, ya sean de tipo oxo- o hidroxi-, presentan una migración similar, pero superior a las AHL sin sustituyentes en el carbono 3 de la cadena lateral.

Hay que resaltar además, los altos niveles de inducción del biosensor que generan las fracciones 25 de las 3 estirpes en estudio, que no se corresponde con el tiempo de elución de ninguna de las AHL descritas hasta el momento. Por lo tanto, no es descartable que los tres rizobios produzcan además AI de naturaleza diferente a las AHL y capaces de inducir al biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) (Figura 4.14.).

Las tres bacterias estudiadas tienen en común la producción de C8-HSL y sus derivados, sugiriendo que en el ambiente natural sería posible la comunicación cruzada entre poblaciones mixtas de bacterias, lo que añade aún más complejidad a los sistemas de QS bacteriano. De hecho, la mayoría de los rizobios estudiados hasta la fecha poseen al menos un sistema implicado en la producción de C8-HSL y/o sus derivados (Tabla 1.5.) (Sánchez-Contreras *et al.*, 2007).

De todos los rizobios en los que se han estudiado los sistemas de QS, las estirpes de *Sinorhizobium meliloti* y la estirpe *Rhizobium sp.* NGR234 son las más relacionadas con *S. fredii* SMH12. *S. meliloti* posee al menos tres sistemas de QS implicados en la producción de la 3-oxo-C8-HSL (sistema *tra*), C8-HSL y otras AHL de cadena corta (sistema *mel*) y varias AHL de cadena larga, desde la C12-HSL hasta la C18-HSL (sistema *sin*) (Marketon *et al.*, 2002). En el caso de NGR234, sólo se ha identificado un sistema, el *tra*, que al igual que en *S. meliloti*, está implicado en la producción de la 3-oxo-C8-HSL. Sin embargo, deben existir dos sistemas más no identificados hasta la fecha, uno implicado en la producción de otras AHL de cadena corta y otro implicado en la producción de AHL de cadena larga (He *et al.*, 2003). Los resultados obtenidos indican que SMH12 posee un perfil de producción de AI similar a los de las estirpes de *S. meliloti* y a *Rhizobium sp.* NGR234, ya que produce la C8-HSL y la 3-oxo-C8-HSL, y al menos otra AHL de cadena lateral corta y una AHL de cadena lateral larga.

La búsqueda mediante PCR de genes de síntesis de AHL a partir de secuencias de genes de bacterias relacionadas filogenéticamente permitió detectar dos genes que codifican sintasas de AHL en el genoma de SMH12, el gen *traI* que fue secuenciado y

publicado como FJ515278 y el gen *traI(2)* que no se pudo aislar y secuenciar adecuadamente. Sin embargo, no fue posible amplificar mediante PCR los genes *mell*, *raiI*, *cinI* y *sinI*. Este último gen, *sinI*, fue detectado en muestras de ADN total del genoma de SMH12 mediante hibridación heteróloga a partir de un amplicón del gen *sinI* de la bacteria *S. fredii* HH103 (datos no mostrados).

Los análisis informáticos de las secuencias de proteínas deducidas de los genes aislados mostraron que la proteína TraI (FJ515278) de *S. fredii* SMH12 posee un 98% y 74% de identidad respecto a las proteínas TraI de *Rhizobium* sp. NGR234 (AAB92427) y *A. tumefaciens* C58 (BAB47268) (Figura 4.15.). En ambas bacterias, esta sintasa de AHL está implicada en la producción de la 3-oxo-C8-HSL (Sanchez-Contreras *et al.*, 2007) por lo que, *a priori*, debe de estar implicada en la producción de la misma AHL en SMH12.

Para determinar en la síntesis de qué inductor estaba implicado el gen *traI* de *S. fredii* SMH12, se construyó el plásmido pMUS1064, que lleva clonado *traI* en pBBR-MCS-5 (Figura 4.25.). Tras introducir por transformación este plásmido en DH5 α , se estudió la producción de AI por esta bacteria mediante TLC. Los resultados mostraron (Figura 4.26.C.) que DH5 α (pMUS1064) produce una mancha con movilidad similar a la que presenta 3-oxo-C8-HSL, esto es, intermedia entre los patrones C6-HSL y C8-HSL.

Sin embargo, cuando se obtuvo el mutante en *traI* de SMH12 (SVQ646) mediante mutagénesis dirigida (Figura 4.16.) y se estudió su producción de AI, se observó que este mutante no mostró diferencias significativas con respecto a la estirpe silvestre en los análisis de TLC (Figura 4.19.). Estos resultados indicarían que debe existir un segundo gen que sintetiza la misma AHL, la 3-oxo-C8-HSL, que el gen *traI*, en el genoma de SMH12. Este gen podría ser, al igual que lo publicado para *Rhizobium* sp NGR234, el gen *traI(2)* (Schmeisser *et al.*, 2009).

La amplificación mediante PCR utilizando los cebadores *traI(2)* genera un amplicón de 1,2 kb en HH103 y en NGR234. En SMH12 también se obtuvo un amplicón de tamaño similar. Sin embargo, sólo se pudo obtener una secuencia de 325 nucleótidos. El análisis informático de esta secuencia demostró la homología con otros genes de síntesis de AHL de tipo *traI*: 70% de identidad con el gen *traI* del pRme41a de *S. meliloti* (AY442932.1) y lo que es más importante, 69% de identidad con el gen *traI* de SMH12 (FJ515278.1). Por lo tanto, el gen *traI(2)* podría estar implicado en la síntesis de varias

AHL de cadena corta, entre las que se encontraría al menos la 3-oxo-C8-HSL y la C8-HSL.

La mancha correspondiente a la AHL de cadena lateral larga detectada mediante TLC (Figura 4.2.) podría ser sintetizada por el gen *sinI* que solo fue detectado mediante hibridación heterológica. *S. fredii* SMH12 contaría pues con al menos tres genes que codifican sintasas de AHL, *traI*, *traI(2)* y *sinI*, implicados en la síntesis de la 3-oxo-C8-HSL; 3-oxo-C8-HSL y C8-HSL; los dos primeros, y en una AHL de cadena larga el tercero (Tabla 5.1.).

Los sistemas de QS descritos en *Rhizobium etli* pasan de 2 a 3 dependiendo de la estirpe estudiada. En *R. etli* CNPAF512 están presentes los sistemas *rai*, implicado en la producción de AHL de cadena corta, y *cin*, que produce una AHL de cadena larga hidroxilada en el carbono 3 (Daniels *et al.*, 2002). La estirpe CFN42 al poseer el plásmido p42a tiene, además, el sistema *tra*, que produce la 3-oxo-C8-HSL y la 3-OH-C8-HSL como moléculas de comunicación celular.

En *R. etli* ISP42, la amplificación por PCR y posterior secuenciación nos permitió detectar únicamente la presencia de dos genes de síntesis de AHL, el gen *raiI* (FJ516401) y el *cinI* (FJ516402). Sin embargo, no se pudo amplificar mediante PCR los genes *traI*, *traI(2)*, *mell* y *sinI*. Las proteínas deducidas a partir de los respectivos genes de síntesis de AHL, RaiI (ACL67951) y CinI (ACL67952), presentan una identidad del 90% y 98%, respectivamente, con las proteínas correspondientes de *R. etli* CFN42 (ABC94330 y ABC91684) (Figura 4.15.).

En CFN42, la proteína RaiI está implicada en la producción de AHL de cadena corta (Daniels *et al.*, 2002). Para estudiar la implicación del gen *raiI* en la síntesis de AI en *R. etli* ISP42, se siguió el mismo procedimiento que en *S. fredii* SMH12. Primero se construyó un mutante dirigido en ese gen, SVQ664 (Figura 4.20.) y además, este mismo gen se introdujo en el plásmido pBBR-MCS-5 (Figura 4.25.). En segundo lugar, se estudió la producción del AI por el mutante y por la estirpe DH5α portadora del plásmido pMUS1071. El perfil de AI mediante TLC de la estirpe mutante *raiI* de *R. etli* ISP42 (SVQ664) mostró una drástica reducción en la producción de las dos manchas con mayor movilidad (Figura 4.22.), que corresponden a la C8-HSL y la 3-OH-C8-HSL. Además, la TLC de la estirpe de *E. coli* DH5α que expresa este gen [DH5α (pMUS1071)] mostró la presencia de una mancha con movilidad intermedia entre C6-

HSL y C8-HSL, similar a la que presentan los derivados oxo- e hidroxi- de la C8-HSL (Figura 4.26.F.). Por todo esto, podemos afirmar que la proteína RaiI de ISP42 está implica en la síntesis de la C8-HSL y la 3-OH-C8-HSL.

En el caso de *cinI*, no se pudo conseguir la estirpe mutante mediante mutagénesis dirigida por recombinación homóloga con el gen interrumpido con el interposón Ω (pMUS1044), aunque sí que se consiguió clonar *cinI* en pBBR-MCS-5 (pMUS1063) (Figura 4.25.). Sin embargo, el estudio de la producción de AI mediante TLC de la estirpe *E.coli* DH5 α pMUS1063 no mostró la presencia de ninguna mancha cromatográfica, a pesar de que se repitió en ensayo concentrando el extracto 5 veces (Figura 4.26.B). Esto no implica necesariamente que CinI no sintetice la 3-oxo-C14-HSL identificada por HPLC-MS/MS ya que, por un lado, las AHL de cadena larga no son fácilmente detectables por el biosensor *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) (Holden *et al.*, 1999), que se usó para revelar la cromatopla; y, por otro lado, la expresión en *E. coli* de los genes *traI* de SMH12 y *rail* ISP42 mostraron manchas en TLC con diámetros menores que las que se observan en las propias TLC de extractos de sobrenadantes de las estirpes silvestres (Figura 4.26. y Figura 4.2.). En resumen, *R.etli* ISP42 contaría, pues, con al menos dos genes que codifican las sintasas RaiI y CinI, implicadas en la síntesis de la 3-OH-C8-HSL y C8-HSL, y 3-oxo-C14-HSL, respectivamente (Tabla 5.1.).

Como se ha indicado en el apartado de Resultados de esta Tesis (Figura 4.10.), los estudios de HPLC acoplada a espectrometría de masas han demostrado que *Rhizobium sllae* IS123 produce tres moléculas AI, la C8-HSL, la 3-OH-C8-HSL, y la 3-oxo-C8-HSL. Para localizar genes implicados en su síntesis se diseñaron cebadores para genes de síntesis de AI de especies de *Rhizobium leguminosarum* y de otras bacterias más o menos relacionadas genéticamente, pero no se consiguió amplificar ninguno de ellos (Tabla 4.3.). En el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, que cuenta con tres sistemas de QS, el sistema *cin* está implicado en la producción de la 3-OH-C14:1-HSL, el sistema *rhi* en la de las C6-HSL, C7-HSL y C8-HSL y el sistema *tra* en la síntesis de 3-oxo-C8-HSL y de C8-HSL. Por el contrario, en la biovariedad *phaseoli*, únicamente se ha detectado un sistema de QS bacteriano, el sistema *rai*, que se basa en la 3-OH-C8-HSL y C8-HSL como moléculas AI. Existen dos posibles explicaciones: que realmente ninguno de los genes de las sintasas descritos para las que se diseñaron cebadores existan en el genoma de IS123 (*traI*, *traI*(2), *sinI*, *rail*, *cinI* o *mell*); o, la más probable,

que los cebadores diseñados no guarden una homología suficiente con los genes de síntesis de AHL del genoma de la bacteria, por lo que la reacción de PCR no genera amplicón. Dado que *R. sultae* IS123 produce la C8-HSL y sus derivados –oxo e –hidroxi, es posible que presenten en su genoma el sistema *tra*, responsable de la síntesis de la 3-oxo-C8-HSL y de la C8-HSL, al igual que en *R. leguminosarum* biovariedad *viceae*, y el sistema *rai*, responsable de la síntesis de la C8-HSL y de la 3-OH-C8-HSL, como ocurre en *R. leguminosarum* biovariedad *phaseoli*.

Tablas 5.1. Resumen de los genes de síntesis de AHL detectados en las tres estirpes en estudio y las AHL que producen.

Organismo	Genes de síntesis	Autoinductores producidos
<i>S. fredii</i> SMH12	<i>traI</i>	3-oxo-C8-HSL
	<i>traI(2)</i>	¿3-oxo-C8-HSL, C8-HSL, otras AHL de cadena corta?
	<i>sinI</i> *	¿AHL de cadena larga?
<i>R. etli</i> ISP42	<i>raiI</i>	3-OH-C8-HSL, C8-HSL
	<i>cinI</i>	3-oxo-C14-HSL
<i>R. sultae</i> IS123	¿?	3-OH-C8-HSL, 3-oxo-C8-HSL, C8-HSL

¿? Autoinductores hipotéticamente sintetizados por los genes de síntesis correspondientes.

* gen detectado por hibridación heteróloga.

Durante el establecimiento de la relación simbiótica entre bacterias de la familia *Rhizobiaceae* y leguminosas se lleva a cabo un intercambio recíproco de señales moleculares que determina el éxito de la simbiosis (Figura 5.1.).

La formación de nódulos en las raíces de la planta comienza con la respuesta de la población ante moléculas exudadas por la planta, principalmente los flavonoides. Los exudados radicales, además, tienen la capacidad de atraer quimiotácticamente a los

rizobios, de tal forma que éstos se acumulan en la superficie de la raíz, especialmente en las zonas cercanas a los pelos radicales.

La acumulación y colonización bacteriana de estas zonas de la raíz está mediada por la producción y percepción de AI, esto es, mediante sistemas de QS bacteriano. En este estadio de colonización, la bacteria inicia, en presencia de flavonoides, la síntesis de los factores de nodulación, de naturaleza lipoquitínoligosacarídica (LCO). Estos LCO por sí solos son capaces de inducir en la planta la curvatura del pelo radical y la aparición de los tubos de infección, a través de los cuales las bacterias viajan desde la rizosfera hasta las células del córtex radical.

Los exopolisacáridos (EPS) bacterianos juegan un papel importante en la entrada a través del tubo de infección, así como en la supervivencia de la bacteria en el nódulo (Straighth y Kolter, 2009). Por último, en algunos rizobios se ha descrito que las proteínas secretadas a través del sistema de secreción de tipo III, las proteínas Nop, están implicadas en la modulación de la respuesta defensiva de las plantas en las fases iniciales de la formación de los nódulos (López-Baena *et al.*, 2009). El esquema del diálogo molecular que se establece durante la simbiosis está representado en la figura 5.1.

Diversos autores han destacado el papel de los flavonoides en la interacción planta-microorganismos, puesto que los flavonoides, además de inducir a los genes anteriormente descritos, también activan la transcripción de numerosos genes relacionados en mayor o menor medida con la simbiosis. Recientemente se ha descrito que ciertos flavonoides son capaces de interferir en los sistemas de QS bacteriano. En concreto, en el trabajo de Vandeputte *et al.* (2010), se ha identificado a un flavonoide, la catequina, producido por *Combretum albiflorum* (Tul.) Jongkind, como molécula que interfiere en los sistemas del QS de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, que controla la producción de factores de virulencia mediante QS. En presencia de este flavonoide, la producción de factores de virulencia de esta bacteria patógena se atenúa.

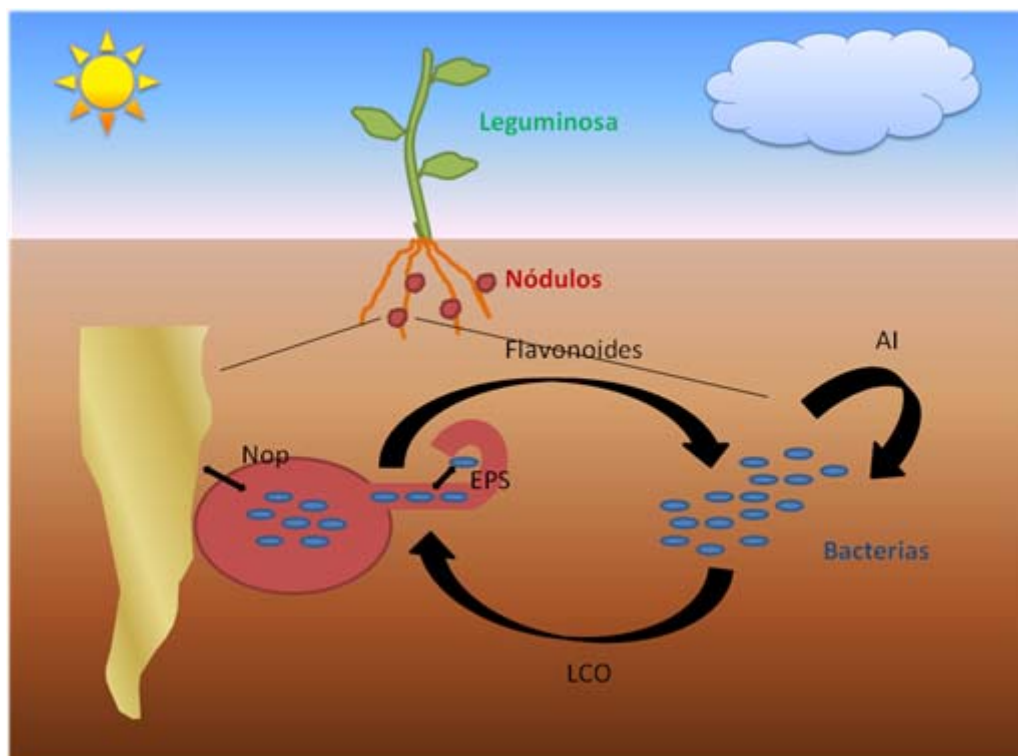


Figura 5.1. Principales señales moleculares durante la simbiosis. Los nódulos se forman como consecuencia de la interacción entre los rizobios y las leguminosas y son el resultado de cambios progresivos en la raíz que permiten una infección controlada por parte de los rizobios. Los flavonoides exudados por la raíz atraen a las bacterias a la superficie radicular y, cuando la población alcanza un quorum determinado, estos flavonoides inducen la síntesis de los factores de nodulación por parte de la bacteria. Estos LCO inducen a la planta a prepararse para la infección de los rizobios. Los EPS bacterianos facilitan la entrada y paso de las bacterias hacia el córtex celular. Una vez dentro del nódulo, algunos rizobios secretan proteínas Nop con las que modulan la respuesta defensiva de las plantas.

En esta Tesis se ha estudiado la influencia de los flavonoides inductores de los genes de nodulación en los sistemas de QS de las tres bacterias en estudio. En primer lugar, se determinó cuales eran los flavonoides inductores de los genes de nodulación de *S. fredii* SMH12, *R. etli* ISP42 y *R. sullae* IS123 introduciendo en cada estirpe el plásmido pMP240, que porta el promotor del gen *nodA* de *R. leguminosarum* fusionado al gen *lacZ* y realizando ensayos de actividad β -galactosidasa en presencia de los diferentes flavonoides (Tabla 4.4.) (Figura 4.27.). Los resultados mostraron que la mayoría de los flavonoides usados inducían los genes *nod* en SMH12, esto es la apigenina, la daidzeina, la 7,4'-dihidroxiavona, la genisteína, la isoliquiritigenina, la morina y la naringenina. ISP42, a su vez, también respondió a varios flavonoides: la apigenina, la 7,4'-dihidroxiavona, la isoliquiritigenina y la naringenina. Sin embargo, los genes *nod*

de IS123 únicamente se inducían en presencia de daidzeína y genisteína. Estos resultados pueden ser explicados por las diferencias en el rango de nodulación de cada especie. De hecho, se ha demostrado que los rizobios con un amplio rango de nodulación responden a un mayor número de flavonoides (Györgypal *et al.*, 1991); (Györgypal y Kondorosi, 1991).

A partir de estos estudios se eligieron, como flavonoides inductores de los genes de nodulación de SMH12, ISP42 e IS123, genisteína, apigenina y daidzeína, respectivamente. Como flavonoides no inductores de los genes de nodulación se eligieron umbeliferona para SMH12 e ISP42 y apigenina para IS123 (Tabla 4.4. y Figura 4.27.). Los flavonoides inductores seleccionados para cada rizobio son producidos por sus respectivas plantas hospedadoras. En concreto, en la soja, la leguminosa con la que nodula *S. fredii* SMH12, se producen los flavonoides apigenina, coumestrol, daidzeína, genisteína, isoliquiritigenina, naringenina, quercetina, 7,4'-dihydroxiflavona y umbeliferona (Pueppke *et al.*, 1998). La judía, planta hospedadora de *R. etli* ISP42, produce los flavonoides quercetina, kaempferol, genisteína y naringenina (Hungria *et al.*, 1991 a,b). Por último, *Hedysarum coronarium*, única planta con la que establece relación simbiótica *Rhizobium sllae* IS123, produce la genisteína, el kaempferol, la quercetina, y otros flavonoides no identificados, entre los que podría estar la daidzeína (Tibe *et al.*, 2011).

Una vez identificados los flavonoides inductores y no inductores de cada estirpe, se estudió su influencia en la producción total de AI en las tres estirpes en estudio mediante ensayos de difusión en pocillos con NT1 (pZRL4).

En los ensayos de difusión en pocillos con sobrenadantes de cultivos de las 3 estirpes cultivadas con o sin flavonoides no se detectaron diferencias significativas en la producción total de AI (Figura 4.28.). Sin embargo, los ensayos realizados con AHL patrones indicaron que son necesarios incrementos de concentración de 5 veces para apreciar variaciones significativas en el halo de inducción alrededor de los pocillos (Figura 4.29.). En los ensayos de cromatografía en capa fina tampoco se detectaron diferencias en la producción de AI en presencia o ausencia de flavonoides, tanto inductores como no inductores de los genes de nodulación (Figura 4.30.). Posiblemente ni los ensayos de inducción en placa ni la TLC son técnicas adecuadas para detectar incrementos del 20% en la producción de AI, dado que como se puede observar en la

figura 4.30., para poder detectar incrementos significativos en los diámetros de las manchas producidas por AHL patrones se requieren incrementos de la concentración de un 500% (5 veces), al igual que lo que ocurría en los ensayos de difusión en placa con AHL patrones (Figura 4.29.).

Por ello, para evaluar la influencia de los flavonoides inductores sobre la producción total de AI, se obtuvieron sobrenadantes de las bacterias en presencia y ausencia del flavonoide inductor de los genes *nod* y de otro no inductor, se filtraron y se añadieron en distintas proporciones a cultivos en fase logarítmica del biosensor NT1 (pZRL4). Los resultados de estos ensayos (Tabla 4.5.) mostraron que cuando se usaron los sobrenadantes de cultivos crecidos con flavonoides inductores de los genes *nod* en las tres estirpes para inducir a *A. tumefaciens* NT1(pZRL4) en cultivo líquido se apreció un incremento significativo (en torno al 20%) en la actividad β -galactosidasa en presencia de los sobrenadantes de las 3 bacterias crecidas con flavonoides inductores de los genes de nodulación respecto a los sobrenadantes de las bacterias crecidas sin flavonoides o con flavonoides no inductores. Además se demostró que este incremento no se debió a que los flavonoides influyan directamente en el biosensor, sino a que indujeron una mayor producción de AI en los rizobio, ya que los controles añadiendo únicamente flavonoides no generaron un incremento en los niveles de inducción del biosensor (Tabla 4.5.).

Cuando se empleó la espectrometría de masas se identificó una nueva molécula de tipo AHL en los sobrenadantes de SMH12 crecidos con genisteína, la C14-HSL (Figura 4.32.). Ninguna otra molécula nueva se detectó en los sobrenadantes de ISP42 y IS123 en presencia de flavonoides inductores (Tabla 4.7.).

Mediante los ensayos de inducción del biosensor *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) en placa microtítulo con las fracciones obtenidas por HPLC-MS/MS de los extractos de sobrenadantes de bacterias pudimos separar y cuantificar cada uno de los AI presentes en los sobrenadantes bacterianos. De esta forma, los ensayos del biosensor usando las fracciones obtenidas por HPLC indicaron una mayor inducción del biosensor con las fracciones provenientes de sobrenadantes obtenidos del cultivo de bacterias en presencia de flavonoides inductores (Figura 4.31.). Además, en general, no aparecieron nuevas fracciones capaces de inducir al biosensor. Estos resultados muestran que no se produce ningún AI nuevo en presencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación,

pero todos ellos incrementaron su concentración en los sobrenadantes de las tres bacterias estudiadas. Es posible que la C14-HSL detectada mediante espectrometría de masas en los sobrenadantes de SMH12 crecida con el flavonoide inductor no sea debida a la síntesis *de novo*, sino que, al producirse un incremento en su producción por efecto del flavonoide, pasa a ser detectada por el método espectrofotométrico empleado. La C14-HSL se corresponde con las fracciones 15-16 en los ensayos de inducción con fracciones (Figuras 4.14. y 4.31.) y sería la responsable de la mancha con menor movilidad en los ensayos de cromatografía en capa fina (Figuras 4.2.). Por ello, podemos asegurar que la AHL de cadena larga, no identificada anteriormente (Tabla 5.1), producida por SMH12 es la C14-HSL, y presumiblemente esta AHL es sintetizada por el gen *sinI*.

Por último, y para confirmar las anteriores observaciones, se estudió la expresión mediante RT-PCR cuantitativa de los genes de síntesis de AHL aislados y secuenciados, *traI* en *S. fredii* SMH12 y *rail* y *cinI* en *R. etli* ISP42. Estos ensayos se realizaron a partir de los ARN de cultivos de las dos bacterias crecidas en ausencia del flavonoide, en presencia de flavonoide no inductor y en presencia de un flavonoide inductor de los genes de nodulación de cada estirpe de rizobio. Los resultados (Figura 4.33.) mostraron que todos los genes de síntesis de AHL incrementaron significativamente su expresión en presencia del flavonoide inductor respecto a los cultivos en ausencia del flavonoide, *traI* sufrió un incremento de 5 veces con daidzeína, *rail* de ISP42, 4 veces y *cinI* de ISP42, 6 veces. La presencia del flavonoide no inductor de los genes de nodulación en cultivos de ambas bacterias, la umbeliferona, generó ligeros incrementos en la expresión de los genes, si bien estos no fueron significativos estadísticamente (Figura 4.34.). Para confirmar si el aumento en la producción de AHL se debía a un incremento en la expresión de los genes de síntesis por la acción de los flavonoides inductores de los genes de nodulación y no a un efecto de estos mismos flavonoides sobre el crecimiento de las estirpes, se realizaron curvas de crecimiento de las bacterias en presencia y ausencia de sus respectivos flavonoides inductores. Como se observa en la figura 4.25. no se produjeron cambios en la tasa de crecimiento de los rizobios por efecto de los flavonoides. Por todo ello, parece claro, que la presencia en los cultivos bacterianos de flavonoides inductores de los genes de nodulación de SMH12, ISP42 y IS123 incrementa la síntesis general de AI.

Todos estos resultados indican que los flavonoides juegan un papel importante en la producción de AI por los rizobios y este efecto es específico de los flavonoides inductores de los genes de nodulación. Esto sugiere que las leguminosas podrían modular la producción de señales de QS que directamente regularían factores implicados en el inicio de la simbiosis (Gao y Teplitski, 2008; Mathesius *et al.*, 2003). De hecho, los flavonoides inductores seleccionados para cada rizobio son producidos por sus respectivas plantas hospedadoras, como ya se ha mencionado.

En los rizobios, los genes regulados por QS identificados hasta la fecha están implicados en la interacción con las leguminosas hospedadoras (Gonzalez y Marketon, 2003). De esta forma, en *B. japonicum* y *R. leguminosarum* biovariedad *viciae*, se ha demostrado que los sistemas de QS controlan, respectivamente, la expresión de los genes *nod* y *rhi*, estos últimos únicamente se expresan en la rizosfera. Ambos grupos de genes son muy importantes durante el proceso de la simbiosis en sus respectivas bacterias. (Cubo *et al.*, 1992; Loh *et al.*, 2002). Además, existen muchas evidencias de que los flavonoides, además de controlar la expresión de los genes *nod*, regulan la expresión de muchos más genes (Perret *et al.*, 2000), y no necesariamente éstos tienen que poseer una *nod box* en su secuencia promotora. Tal es el caso de genes implicados en la secreción de proteínas a través del sistema de secreción de tipo III (Deakin y Broughton, 2009). Por ello, no es de extrañar, que directa o indirectamente, los flavonoides específicos de los genes de nodulación puedan potenciar los sistemas de QS de los rizobios favoreciendo, así, el establecimiento de la simbiosis. Por otro lado, recientemente, se ha identificado un flavonoide, la catequina, como inhibidor de los sistemas de QS de *P. aeruginosa* PAO1. En esta bacteria patógena de plantas, los factores de virulencia están controlados por QS, por lo que la producción de flavonoides específicos impide la producción de factores de virulencia en la bacteria, protegiendo así a la planta (Vandeputte *et al.*, 2010).

Las plantas, por lo tanto, podrían regular la expresión de AI producidos por bacterias a través de moléculas exudadas por la raíz, entre ellos los flavonoides, favoreciendo o impidiendo específicamente la síntesis de factores regulados por QS, que serían necesarios para la interacción simbiótica o patógena, respectivamente (Figura 5.2.).

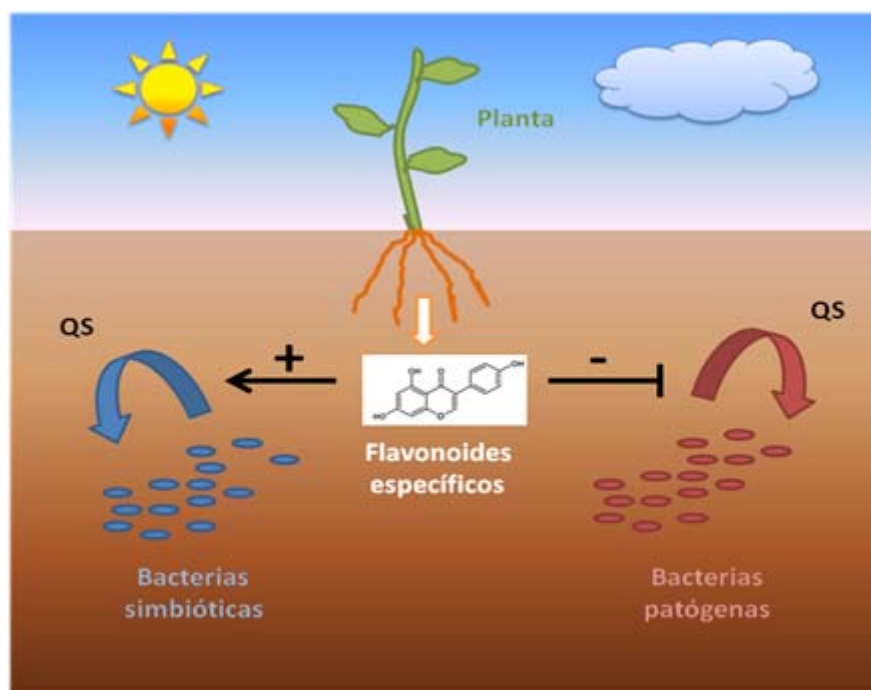


Figura 5.2. Modelo de interferencia en los sistemas de QS bacteriano a través de exudados radicales. La planta, a través de exudados radicales, como por ejemplo flavonoides específicos, es capaz de interferir en los sistemas de QS bacteriano. En bacterias patógenas esa interferencia sería de tipo negativo, inhibiendo así la producción de factores de virulencia. En bacterias beneficiosas, como en el caso de los rizobios, los flavonoides específicos de los genes de nodulación potencian los sistemas de QS, favoreciendo la expresión de genes regulados por estos sistemas, que suelen ser importantes para una simbiosis eficiente.

Como se ha dicho, la mayoría de los genes regulados mediante QS en bacterias de la familia *Rhizobiaceae* están implicados de algún modo en el éxito de la simbiosis con la leguminosa (Sánchez-Contreras *et al.*, 2007). Ante la dificultad para aislar cada uno de los genes de síntesis de AI en SMH12 y en ISP42, así como la de conseguir mutantes en todos los genes, se construyeron estirpes de SMH12 y ISP42 que expresan el gen *aiiA* de *Bacillus cereus* A34 [SMH12 (pME6863) e ISP42 (pME6863)], que codifica una lactonasa, enzima que rompe el anillo lactónico de las AHL y, de este modo, contar con estirpes defectivas en la producción de AHL y conocer en mayor profundidad el papel de estas moléculas en distintas propiedades de estos rizobios, en particular, todo lo relacionado con la simbiosis.

SMH12 (pME6863) mostró una reducción completa de la producción de AI, tal y como se observa en los resultados de análisis mediante TLC (Figura 4.23.), sin

embargo, esta reducción no fue tan drástica en el caso de ISP42 (pME6863) (Figura 4.24.).

Para determinar la implicación de los distintos sistemas de QS de *S. fredii* SMH12 y *R. etli* ISP42, se realizaron ensayos de nodulación con el mutante *traI* (SVQ646) y la estirpe defectiva en la producción de AHL [SMH12 (pME6863)] en *Glycine max* cv Osumi en el caso de SMH12. Paralelamente se ensayaron también el mutante en el gen *rail* (SVQ664) de ISP42 y la estirpe defectiva en producción de AHL [ISP42 (pME6863)] en *Phaseolus vulgaris* cv BBL para ISP42 y derivados. Los resultados de estos ensayos de nodulación mostraron que, en el caso de SMH12, no se apreciaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros estudiados (número de nódulos, peso fresco de los nódulos y peso seco de la parte aérea), excepto en el caso de la estirpe de SMH12 que expresa la enzima lactonasa, SMH12 (pME6863), que mostró una reducción significativa en el número de nódulos respecto a la estirpe silvestre (Figura 4.35. y 4.36.). Para el resto de parámetros estudiados (PF de los nódulos y PS de la parte aérea), no se detectaron diferencias significativas entre el silvestre y la estirpe que expresa la enzima lactonasa, si bien se observó una tendencia a un menor peso fresco de los nódulos y un menor peso seco de la parte aérea. Los parámetros simbióticos de la estirpe mutante *traI* no difirieron respecto a los de la estirpe silvestre SMH12.

Tampoco en el caso de los derivados de *R. etli* ISP42, el mutante *rail* (SVQ664) y la estirpe que expresa la enzima lactonasa [ISP42 (pME6863)] se observaron cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados en los ensayos de nodulación con *Phaseolus vulgaris* cv BBL, aunque sí que se apreció una tendencia a la reducción del peso seco de la parte aérea en ISP42 (pME6863).

En *R. etli* CNPAF512, el sistema *cin* está implicado en la inhibición del crecimiento, en el desarrollo del simbiosoma y en la fijación de nitrógeno. Por el contrario, el sistema *rai*, además de inhibir también el crecimiento, suprime la nodulación y la fijación de nitrógeno (Daniels *et al.*, 2002). Estos resultados contrastan con lo obtenido en ISP42, ya que ni en el mutante *rail*, ni en la estirpe ISP42 (pME6863), se observan diferencias significativas en los parámetros simbióticos analizados. Es posible que, como se observa en los resultados de la TLC, tanto el mutante *rail* como la estirpe con lactonasa, aún sigan produciendo valores suficientes de AHL para no alterar significativamente el comportamiento simbiótico.

Los resultados de baja eficiencia para la nodulación con la soja por la estirpe *S. fredii* SMH12 portadora de la lactonasa frente a la estirpe silvestre, parecen implicar a los sistemas de QS de esta bacteria con una simbiosis efectiva con esta plantas. Sin embargo, en *Rhizobium sp.* NGR234 y *S. meliloti*, las dos bacterias más relacionadas filogenéticamente con SMH12, el papel de los sistemas de QS durante la simbiosis no está definido claramente. Se sabe que en ambas estirpes, el sistema *tra* está implicado en la transferencia de plásmidos (He *et al.*, 2003; Gonzalez y Marketon, 2003). En *S. meliloti* Rm1021, se sabe además que el sistema *sin* regula la producción del EPSII, muy importante durante la simbiosis, así como algunos tipos de movilidad presentes en esta bacteria (Gao *et al.*, 2005).

En base a los resultados obtenidos, se eligió a *S. fredii* SMH12 para conocer en profundidad otros procesos que están regulados mediante sistemas de QS, especialmente aquellos que están implicados en la correcta interacción simbiótica con la leguminosa. Así, se estudió el papel de la proteína NodD1 en la inducción de los sistemas de QS por los flavonoides inductores específicos de los genes de nodulación. Con este objetivo se construyó un mutante en el gen *nodD1*, SVQ648, (Figuras 4.18.) y se comprobó mediante TLC que no presentaba diferencias en la producción de AI frente a la estirpe silvestre (Figura 4.19.). A continuación se cuantificó la influencia de los flavonoides sobre la expresión del gen de síntesis *traI* mediante qPCR en este mutante frente a la estirpe silvestre y a la que porta el gen de la enzima lactonasa (Figura 4.39.). Como se observa en dicha figura, el mutante *nodD1* de SMH12 presenta un incremento en la expresión de *traI* en ausencia de flavonoides similar al que presenta la estirpe silvestre con el flavonoide inductor, lo que implicaría que la proteína NodD1 regularía negativamente la inducción de los sistemas de QS en dicha bacteria. Esto no significa necesariamente que no se requiera la producción de AI para la expresión de los genes de síntesis de AI, ya que, mediante PCR cuantitativa, se observó que la expresión del gen *traI* en la estirpe deficiente en AHL [*SMH12* (pME6863)] (Figura 4.39.), tanto en ausencia como en presencia de flavonoide inductor, fue similar a la obtenida en el silvestre sin flavonoides. Por tanto, podemos concluir que para una correcta expresión del gen *traI* son necesarios no solo los flavonoides inductores, sino también los AI correspondientes. NodD1 tendría un papel en las condiciones no simbióticas inhibiendo el aumento de expresión de *traI* en presencia de flavonoides.

He *et al*, en 2003, describieron los sistemas de QS presentes en *Rhizobium* sp. NGR234. Únicamente identificaron inequívocamente la presencia del sistema *tra*, homólogo al sistema presente en *A. tumefaciens* que está implicado en la transferencia del plásmido Ti. Esta transferencia ocurre únicamente en presencia de unos compuestos producidos por la planta, las opinas, que incrementan la expresión del gen *traR*, cuya proteína se encuentra secuestrada por la proteína TraM. El incremento de la cantidad de proteína TraR permite que exista elemento regulador disponible para su unión con los AI. Por ello, en presencia de opinas, se activa la proteína TraR por unión al AI, y se inicia así la transcripción del operón de transferencia del plásmido (Fuqua *et al.*, 1994). En NGR234, la proteína TraR también se encuentra secuestrada por TraM. Sin embargo, no se conoce la señal, equivalente a las opinas de *A. tumefaciens*, que incrementa la expresión del gen *traR*. De hecho, únicamente sobreexpresando la proteína TraR se conseguía aumentar la frecuencia de transferencia del plásmido simbiótico. Además, en *A. tumefaciens* deben existir otros dos sistemas más de síntesis de AI, que también incrementaron su expresión por la sobreexpresión de la proteína TraR.

En SMH12 (muy relacionada filogenéticamente con NGR234) los flavonoides específicos de los genes de nodulación podrían ser la señal que incrementa la cantidad de proteínas TraR, pudiéndose activar ahora por los AI. Al igual que ocurre en NGR234, los otros dos sistemas de QS presentes en SMH12, el sistema *traI(2)* y el sistema *sin*, también incrementarían su expresión, por lo que se daría un incremento general en la producción de AI (Figura 5.3.). De esta forma, con una única molécula simbiótica, los flavonoides, se iniciaría, por un lado, la producción de factores de nodulación y de proteínas Nop mediante activación por la proteína NodD1 y, por otro lado, la activación de los sistemas de QS bacteriano, ya que la proteína NodD1 se emplearía en la activación de los procesos citados anteriormente, y dejaría de inhibir la expresión de *traR* (Figura 5.3.).

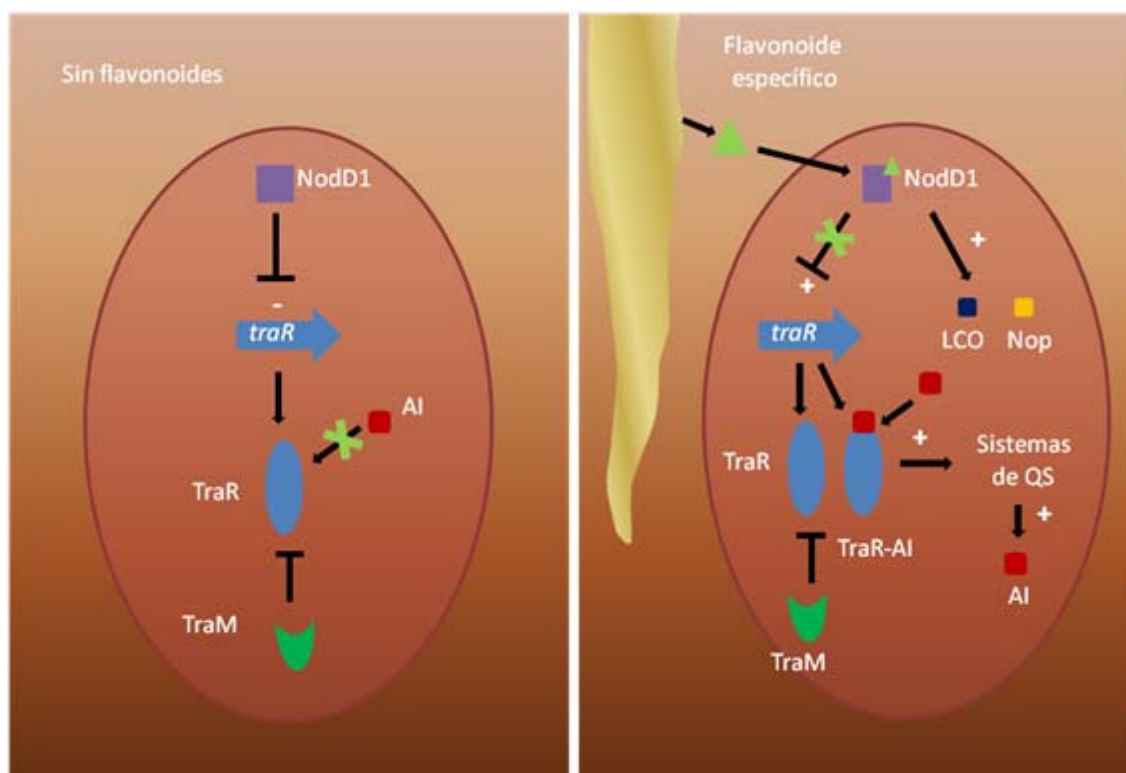


Figura 5.3. Hipótesis de activación de los sistemas de QS en *S. fredii* SMH12. En ausencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación, la proteína NodD1, directa o indirectamente, estaría inhibiendo la expresión de *traR*. La síntesis de AI se produce, pero no pueden ser reconocidos por TraR, ya que se encuentra secuestrado por la proteína TraM. En presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación, NodD1 dejaría de reprimir la expresión de *traR*, e induce la producción de factores de nodulación (LCO) y proteínas Nop. El incremento de proteína TraR permitiría su activación por los AI. El complejo TraR-AI sería el encargado de activar al resto de sistemas de QS, con lo que se incrementaría la producción total de AI, iniciándose así una serie de procesos regulados por QS necesarios para la simbiosis.

Otro de los factores importantes regulados por QS es el desarrollo del biofilm, en el que, a su vez, influyen la producción de exopolisacáridos, la movilidad bacteriana, así como ciertos factores físicoquímicos (Rinaudi y Giordano, 2010). Por ello, se estudió la influencia del QS sobre la producción de exopolisacáridos, sobre el perfil electroforético de los LPS y sobre la producción de las proteínas Nop.

Los resultados mostraron que no existían diferencias en las producciones de exopolisacáridos cuando se compararon la estirpe silvestre y la estirpe con la lactonasa crecidas durante 5 días en placas de YMA. (Figura 4.41.A). Tampoco se apreciaron diferencias en la producción de EPS cuando se compararon estas mismas estirpes en medio YMA suplementado con flavonoides no inductores de los genes de nodulación

(Umbeliferona) o con flavonoides inductores de los genes de nodulación (Daidzeína). Al analizar el perfil electroforético de LPS tampoco se apreciaron diferencias entre la estirpe silvestre y la que expresa la enzima lactonasa, tanto en presencia como en ausencia del flavonoide inductor de los genes de nodulación, la daidzeína (Figura 4.41.B.).

En cuanto al estudio de las proteínas extracelulares, se ha puesto de manifiesto que SMH12 produce en presencia del flavonoide inductor genisteína al menos 5 proteínas Nop diferentes. La estirpe que expresa la enzima lactonasa, SMH12 (pME6863), produjo las mismas Nop en presencia de genisteína, lo cual indica que los sistemas de QS tampoco regulan la producción de proteínas Nop en SMH12 (Figura 4.40.).

Así pues, los estudios con la estirpe de SMH12 deficiente en QS, que expresa la enzima lactonasa, indican que los sistemas de QS no regulan la producción de EPS, LPS o proteínas extracelulares Nop.

En los estudios de movilidad, se ha puesto de manifiesto que *S. fredii* SMH12 no posee movilidad tipo “swarming” (datos no mostrados), pero sí de tipo “swimming” (Figura 4.42. y Figura 4.43.). Sin flavonoides, tanto SMH12, como los mutantes *nodD1*, *traI*, así como la estirpe que expresa lactonasa, poseen movilidades similares, incrementándose el halo de movilidad unos 4 mm al día, aunque en la estirpe que expresa la enzima lactonasa se aprecia una tendencia a menor movilidad tipo swimming (Figura 4.42.A). Si el medio se suplementa con flavonoides inductores de los genes de nodulación, el halo de movilidad se incrementa hasta el cuarto día, momento el halo deja de crecer. Además, el mutante *nodD1* posee una tendencia a presentar una mayor movilidad y la estirpe con la lactonasa, a una menor movilidad, aunque en ningún caso las diferencias son estadísticamente significativas (Figura 4.42.B).

Durante las primeras fases de la colonización de la raíz, la planta exuda a través de la raíz una serie de moléculas que atraen quimiotácticamente a los rizobios a la rizosfera. Esta movilidad bacteriana está regulada en muchas bacterias mediante sistemas de QS (Merrit *et al.*, 2007). Por ello, es explicable que tanto sin flavonoides como con ellos se aprecie una tendencia a menor movilidad en la estirpe de SMH12 deficiente en QS (que expresa la enzima lactonasa) respecto a la silvestre. La explicación a la inhibición de la movilidad en presencia de flavonoides en el medio puede ser debida a que la población

bacteriana detecta concentraciones muy altas de este componente del exudado radical, por lo que podría reconocer que está en la rizosfera, y dejaría de moverse.

Una vez en la rizosfera, la población de rizobios coloniza la superficie de la raíz mediante la formación de una comunidad bacteriana rodeada de una matriz producida por las propias bacterias que están unidas reversiblemente a la superficie de la raíz, el *biofilm*. Los factores intrínsecos a la bacteria que son necesarios en la formación de los *biofilm* en bacterias de la familia *Rhizobiaceae* son, principalmente, la movilidad bacteriana, la producción de EPS, de factores de nodulación y los sistemas de QS bacterianos (Rinaudi y Giordano, 2010).

Cuando se estudió la influencia del flavonoide inductor de los genes *nod* (genisteína) sobre la adhesión a soportes abióticos de SMH12, de sus mutantes en *traI* y *nodDI* y en la estirpe que porta el gen que codifica la lactonasa (Figura 4.44.), se observó que la genisteína inhibe la adhesión a los pocillos drásticamente tanto en la estirpe silvestre como en el mutante *traI*. En el mutante *nodDI*, esta inhibición se daba en una menor proporción. Sin embargo, en la estirpe que expresa la lactonasa, que ya de por sí presenta una menor adhesión, cuando se crece en presencia de genisteína, no se produce esta inhibición de la adhesión. De estas observaciones se podría concluir que los flavonoides tienen un papel clave en la capacidad de adhesión de SMH12, disminuyéndola, y en esta inhibición no parecen estar implicados ni *traI* ni *nodDI*, pero sí las AHL, dado que en su ausencia no se reduce significativamente la adhesividad.

Los estudios de la formación de *biofilm* sobre una superficie de cristal mediante microscopía confocal indicaron que las bacterias en ausencia de flavonoides forman un *biofilm* de tipo monocapa. Sin embargo, en presencia de flavonoides inductores de los genes de nodulación aparecen menos bacterias pero éstas se agregan formando *biofilm* de tipo microcolonia (Figura 4.45.A y 4.46.A). La estirpe mutante en *traI* no difiere significativamente en su comportamiento con la estirpe silvestre en los estudios de microscopía confocal, por lo que parece que el sistema *tra* de QS no estaría implicado en la formación de *biofilm* (Figura 4.45.B y 4.46.B). Sin embargo, la mutación en el gen *nodDI* implica que, aún en presencia de flavonoide específico, la bacteria genera *biofilm* de tipo monocapa, y los valores de adhesión de los ensayos en placa microtítulo, con o sin flavonoides, son similares a los de la estirpe SMH12 sin flavonoides (Figura 4.45.C y 4.46.C). Por último, en el caso de la estirpe que expresa enzima lactonasa, la

visualización al microscopio confocal indicó que la formación de biofilm sobre cristal tipo monocapa en ausencia de flavonoides es más irregular, lo que concuerda con los resultados de los ensayos de adhesión en placas microtítulo, en los que se observó una menor adhesión respecto a la estirpe silvestre. En presencia de flavonoides específicos, se apreciaron agrupaciones bacterianas que no llegan a estar tan definidas como en la estirpe silvestre (Figura 4.45.D y 4.46.D).

En resumen, *Sinorhizobium fredii* SMH12 forma dos tipos de biofilm sobre cristal, uno de tipo monocapa que cubre toda la superficie y otro de tipo microcolonia, en las que hay un menor número de células que se agrupan en determinados puntos de la superficie. Este último tipo únicamente se da en presencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación y requiere del gen *nodDI*. La formación de ambos tipos de biofilm depende, además, de los sistemas de QS. De hecho, en la mayoría de los rizobios estudiados hasta la fecha, la formación de biofilm está regulada de una u otra forma mediante sistemas de QS bacteriano (Rinaudi y Giordano, 2010). En *S. meliloti*, se ha demostrado que los genes *nodD1ABC*, implicados en la producción de los factores de nodulación (LCO), son necesarios para que el biofilm tenga una arquitectura tridimensional. De hecho, la mutación en cualquiera de estos genes, implica formación de biofilm de tipo monocapa. Además, parece ser que la estructura básica de estos factores de nodulación, los oligómeros de N-acetil-glucosamina sin decorar, forman parte de la matriz del biofilm. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en *S. fredii* SMH12, en *S. meliloti*, para la formación de biofilm con estructura tridimensional, no es necesaria la presencia del flavonoide inductor de los genes de nodulación, si bien sí que se potencia en presencia de éste (Fujishige *et al.*, 2006).

Estos resultados pueden indicar que la deficiencia en nodulación de la estirpe de SMH12 con la lactonasa puede ser debida a una anómala formación de biofilm y menor movilidad de tipo swimming que se dan en presencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación, lo cual repercutiría en la correcta colonización de la raíz de la soja. Para constatar esta hipótesis se realizaron ensayos de colonización de raíces mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía electrónica de barrido. Para estos estudios, previamente se marcaron las estirpes con la proteína de fluorescencia verde portada por el plásmido pBBR-MCS-5, y se usaron para inocular por separado plantas de soja del cultivar Osumi. Siete días después de la inoculación las plantas se recogieron

y fueron procesadas para su observación mediante microscopía de epifluorescencia y en estudios complementarios de microscopía electrónica de barrido.

Los estudios de epifluorescencia mostraron una menor presencia de la bacteria en las raíces laterales de la soja cuando se expresa la enzima lactonasa. Sin embargo, no se apreciaron diferencias en la colonización en la zona del tronco de la raíz, cercana al punto de inoculación de la bacteria. Tampoco se apreciaron diferencias respecto a la estirpe silvestre en la colonización de la raíz por parte del mutante *nodDI* (Figura 4.47.).

Los experimentos de microscopía electrónica de barrido constataron que la estirpe de SMH12 que expresa la enzima lactonasa apenas coloniza las raíces laterales y el ápice de la raíz de la planta. En el caso del mutante en *nodDI*, sí que se apreció colonización de todas las zonas de raíz. Sin embargo, en las zonas más distales al punto de inoculación, las raíces laterales ni el ápice, las bacterias se distribuían al azar sobre la superficie de la raíz, lo que contrasta con el tipo de distribución presente en la estirpe silvestre SMH12, en el que las bacterias aparecen principalmente agrupadas (Figuras 4.48., 4.49. y 4.50.). El mutante *nodDI*, como cabía esperar, no noduló con la soja bv Osumi (4.35. y 4.36.), si bien esto se debe a que el gen *nodDI* está mutado y por ello no responde a los flavonoides producidos por la planta.

Por último, para confirmar que las diferencias observadas en los experimentos anteriormente realizados se deben exclusivamente a la acción de la enzima lactonasa y no a diferencias en el crecimiento se realizaron curvas de crecimiento de en medio YM(3) de SMH12, de los mutantes *traI* y *nodDI*, y de la estirpe que expresa la enzima lactonasa. Como se observa en la figura 4.51., no se apreciaron diferencias en la tasa de crecimiento de las diferentes estirpes respecto al silvestre.

Por todo ello, para una simbiosis eficiente parece clave que en los estadíos iniciales se produzca una correcta colonización de la raíz de la soja por parte de *S. fredii* SMH12. Para que se colonice toda la raíz de la leguminosa serían necesarios los sistemas de QS bacteriano, ya que están implicados en movilidad de tipo swimming y, sobre todo, en la formación de biofilm de tipo microcolonia que se da únicamente en presencia de flavonoides específicos de los genes de nodulación, esto es, en la rizosfera. Ambos procesos son necesarios para la colonización de todas las zonas de la raíz.

El otro de los objetivos principales de esta Tesis fue el estudio de moléculas producidas por plantas de *Oryza sativa* cv. Puntal y *Phaseolus vulgaris* cv. BBL que puedan interferir en los sistemas de QS bacteriano. Mediante el uso de los biosensores *C. violaceum* CV026, *A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) y *E.coli* JM109 (pSB536) en los ensayos de difusión en placa con las plantas de arroz, se detectaron moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano en todas las muestras analizadas (Tabla 4.8.), excepto en los exudados de semilla (ESA), que no indujeron a ninguno de los biosensores. Curiosamente, las muestras de distinta procedencia indujeron a unos biosensores o a otros. De esta forma, los biosensores NT1 (pZRL4) y CV026, tanto en ensayo directo como en ensayo reverso, no detectaron moléculas de tipo IQS en los exudados de semilla (ESA) ni en los exudados de raíz (ERA) (Figura 4.52.). En cambio, JM109 (pSB536) sí lo hizo en los exudados de raíz de arroz (ERA). Los extractos de semillas, posiblemente más concentrados con respecto a los exudados, consiguieron inducir a NT1 (pZRL4) y a JM109 (pSB536) (Figura 4.53.). Finalmente, las raíces completas indujeron a todos los biosensores, excepto a CV026 en ensayo directo (Figura 4.54.). Estos datos parecen indicar que, por un lado, las plantas de arroz no producen altas concentraciones de IQS, y por otro lado, que la producción depende de cierta actividad de la raíces, o del estado fisiológico de la planta, que justificaría su detección en los exudados de raíz o en las raíces completas. La detección diferencial por los distintos biosensores, en particular, en los casos de CV026 en ensayos directos y reversos, podría indicar una estructura química de las moléculas producidas distinta a la de las AHL.

En el caso de la judía, se obtuvieron datos completamente distintos (Tabla 4.8.). Por una parte, los exudados de semilla sí que dieron señal en los biosensores NT1 (pZRL4) y JM109 (pSB536) en los ensayos de difusión en placas (Figura 4.52.). En segundo lugar, los exudados de raíz no mostraron actividad en ningún biosensor, y los extractos de semilla se comportaron como sus exudados, activando solo a NT1 (pZRL4) y JM109 (pSB536) (Figura 4.53.). Por último, las raíces de judía también manifestaron distinto comportamiento a las del arroz, dado que mientras estas últimas activaron la producción de violaceína de CV026 en ensayo reverso, lo que podría significar que las moléculas que IQS del arroz activarían al sistema *cvi* de CV026, en el caso de la judía, se inhibe la producción de violaceína, con lo que se comportaría de modo similar a una AHL de cadena larga, inhibiendo el sistema *cvi* (Figura 4.54.).

Las primeras moléculas identificadas químicamente que interfieren en los sistemas de QS bacteriano fueron las furanonas halogenadas (Manefield *et al.* 1999). Estas moléculas, producidas por un alga roja, se consideran miméticas estructurales por su similitud en la estructura química con las AHL y, de hecho, compiten con éstas en la unión al elemento regulador de tipo LuxR.

Posteriormente, en el año 2000, Teplitski *et al.* describieron la presencia de moléculas en los exudados de semillas de guisante (*Pisum sativum*) que potenciaban o inhibían una serie de fenotipos regulados por QS en bacterias biosensoras. Sin embargo, no se conoce aún la naturaleza química de estas moléculas que mimetizaban el comportamiento de las AHL. Desde entonces hasta ahora se han detectado e identificado una serie de moléculas presentes en plantas superiores capaces de interferir positiva o negativamente en los sistemas de QS bacteriano. Sin embargo, a excepción de lo que ocurría con las furanonas halogenadas, el resto de moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano identificadas posteriormente no guardan ninguna similitud química con las AHL. Tal es el caso de la L-canavanina (Weeks, 1977), un aminoácido derivado de la arginina presente en las semillas de muchas leguminosas; de las opinas (Zhu *et al.*, 2000), derivados de aminoácidos que producen ciertas plantas; de la flavan-3-ol catequina (Vandeputte *et al.*, 2010), un tipo de flavonoide producido por *Combretum albiflorum*; de las hormonas humanas adrenalina y noradrenalina (Sperandio *et al.*, 2003) o de la patulina (Rasmussen *et al.*, 2005), molécula producida por ciertos hongos. Todas estas moléculas parecen actuar directamente sobre la proteína reguladora de tipo LuxR, bien promoviendo una mayor síntesis o bien promoviendo una rápida degradación.

Hasta la fecha, mediante el uso de biosensores, se han identificado moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano en diferentes muestras (exudados, extractos, etc.) de plantas de guisante, tomate, (Tepliski *et al.*, 2000), *Medicago truncatula* (Gao *et al.*, 2003), *Medicago sativa* (Keshavan *et al.*, 2005), ajo (Bjarnsholt *et al.*, 2005), arroz (Degrassi *et al.*, 2007), *Conocarpus erectus*, *Chamaesyce hypericifolia*, *Callistemon viminalis*, *Bucidabuceras*, *Tetrazygia bicolor*, *Quercus virginiana* (Adonizio *et al.*, 2008) y *Combretum albiflorum* (Vandeputte *et al.*, 2010). En cada uno de ellos, el tipo de muestras de donde se han obtenido, así como los biosensores en los que se han detectado, son completamente diferentes. Solo en dos plantas, se han identificado químicamente estas moléculas, la L-canavanina, un derivado

de aminoácido, en *Medicago sativa* y la flavan-3-ol catequina, un flavonoide, en *Combretum albiflorum*. Por todo ello, parece ser que cada planta interfiere en los sistemas de QS mediante un mecanismo diferente, es decir, posiblemente a través de moléculas diferentes.

Hasta la fecha no se ha descrito que plantas de *Phaseolus vulgaris* produzcan moléculas que IQS. Sin embargo, sí se ha demostrado que las plantas de *Oryza sativa* contienen moléculas que interfieren con los sistemas de QS de tres biosensores bacterianos diferentes. Estas moléculas, además, son susceptibles de degradación por la enzima lactonasa, por lo que los autores proponen que la estructura química de estas moléculas debe ser similar o incluso idéntica a las de las AHL (Degrassi *et al.*, 2007).

Para determinar la naturaleza química de las moléculas IQS detectadas en los ensayos con los extractos de semilla de arroz y de judía, se llevaron a cabo distintos estudios, desde la separación mediante TLC, el tratamiento con pH alcalino para provocar la lactonólisis, y el empleo de biosensores que han perdido la capacidad de detectar las AHL y que fueron contruidos durante este Tesis para tal fin [*A. tumefaciens* NT1 (pZRL4) (pME6863) y *E. coli* JM109 (pSB536)].

A pesar de que el tratamiento de alcalinización hasta pH 9,5 de los extractos de semilla de arroz y judía determinó la pérdida de su actividad, al igual que la de las AHL patrón, usando al biosensor NT1 (pZRL4) (Figura 4.56.). Sin embargo, los extractos de semilla de ambas plantas sin tratar mantenían su capacidad de inducir a NT1 (pZRL4) (pME6863) (Figura 4.57.), por lo que se podría pensar que las moléculas IQS del arroz cv Puntal y de la judía cv BBL no son de naturaleza AHL. Datos que fueron corroborados cuando se realizaron ensayos con las raíces completas, ya que se observó que tanto las raíces de arroz como las de judía seguían induciendo al biosensor JM109 (pSB536) (pME6863), portados de la lactonasa (Figura 4.58.).

Los análisis mediante TLC y revelado con NT1 (pZRL4) y NT1 (pZRL4) (pME6863) (Figura 4.55. y Figura 4.59.) demostraron la presencia de moléculas muy escasa movilidad en ambos extractos de semilla, que disminuyeron en intensidad en el caso de EXA, pero en el de EXJ, con el biosensor portador de la lactonasa. Por lo que aún cabe pensar que en los dos extractos se encontrarían moléculas de naturaleza distinta a las AHL, sin descartar su presencia en el caso de extractos de arroz (EXA).

Finalmente, para intentar determinar más específicamente cuántas moléculas y de qué tipo están presentes en los extractos de semillas de arroz cv Puntal y judía cv BBL se diseñó un método consistente en la concentración de los extractos de semilla de ambas plantas hasta sequedad, para disolverlo finalmente en metanol 50 % y fraccionarlo en cartuchos de extracción en fase sólida SPE-C18. Las fracciones fueron obtenidas mediante una primera elución con metanol al 50 % (A), y eluciones sucesivas con metanol al 50% (B), 60 % (C), 70 % (D), 80 % (E), 90 % (F) y 100 % (G). Las fracciones, una vez evaporadas y tratadas, fueron analizadas para determinar su actividad β -galactosidasa en placas microtítulo usando como biosensores a NT1 (pZRL4) y NT1 (pZRL4) (pME6863). Los resultados con las fracciones provenientes de los extractos de semilla de arroz (Figura 4.60. y Figura 4.63.) mostraron que aparecen al menos dos tipos de moléculas capaces de inducir al biosensor sin lactonasa, una en las fracciones más polares [metanol 50% (B) y metanol 60%(C)], y otra en las fracciones más apolares [metanol 90% (F) y metanol 100% (G)]. Las fracciones más polares (B y C) inducían también al biosensor con la lactonasa. Sin embargo, las moléculas presentes en las fracciones más apolares (F y G) eran susceptibles del ataque por la enzima lactonasa, lo que indica que estas moléculas pueden ser de tipo AHL (Figura 4.60. y Figura 4.63.). Todos estos resultados parecen indicar que en los extractos de semilla de arroz existen dos tipos de moléculas capaces de inducir a los biosensores: una de ellas con estructura química similar a la de las AHL y, la otra, con estructura química diferente. Esto explicaría que en los ensayos de TLC se apreciara una reducción en la intensidad de la señal de los extractos de semilla de arroz cuando se usó al biosensor con lactonasa (Figura 4.59.).

En el artículo de Degraasi *et al.* (2007), en el que se demostraba que las moléculas que IQS producidas por arroz eran susceptibles del ataque por lactonasa, se discute la procedencia de estas moléculas, no descartando el posible origen bacteriano. Hasta la fecha se ha descrito la presencia de varias bacterias Gram negativas endófitas en plantas de arroz (Tan *et al.*, 2001). A pesar de que la densidad de estas bacterias dentro de la planta no es muy alta (menos de 10^7 células por gramo de material vegetal), no se puede descartar la producción de AHL por estas bacterias en el interior de la planta (You *et al.*, 2005). Son necesarias, por lo tanto, pruebas adicionales que demuestren la producción de AHL por las bacterias endófitas para sustentar o descartar esta hipótesis.

Cuando se realizó el mismo tipo de estudio con los extractos de semilla de judía, se detectó la presencia de una única molécula en extractos de semilla de judía presente en la fracción más polar [metanol 50% (B)], además de en el control (fracción A). Esta molécula, como cabía esperar, no era susceptible a la acción de la enzima lactonasa, por lo que su naturaleza química debe ser diferente a la de las AHL. Las fracciones A y B, debido a la alta inducción obtenida con ambos biosensores, se utilizaron en experimentos de HPLC acoplada a espectrometría de masas en los que se buscaron moléculas de tipo AHL. No se encontraron moléculas de tipo AHL en las fracciones A y B de los extractos de semilla de judía cv BBL mediante espectrometría de masas.

La naturaleza química de las moléculas capaces de inducir al biosensor con lactonasa detectadas en los extractos de semilla de judía, y en los extractos de semilla de arroz, es aún desconocida. El fraccionamiento de los extractos de semilla es un primer paso en la identificación química de estas moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano. Sin embargo, la caracterización final de estas moléculas puede ser complicada, ya que no existe un único tipo de moléculas que lleven a cabo esta acción (ej., flavonoides, derivados de aminoácidos, etc.) y, de hecho, la naturaleza química en la mayoría de las plantas en las que se ha detectado este tipo de moléculas está aún por determinar.

Los exudados radicales de las leguminosas tienen un enorme poder de atracción sobre las bacterias en general y sobre los rizobios en particular. En estos últimos, los flavonoides exudados por la planta disparan respuestas quimiotácticas que dirigen directamente al rizobio hacia un hospedador compatible. Además, estos flavonoides específicos son detectados por la proteína NodD1, iniciándose la transcripción de los genes de nodulación, que codifican una batería enzimática encargada de la síntesis de los factores de nodulación. La planta, a su vez, cuando detecta los factores de nodulación, inicia un proceso de diferenciación celular en las raíces que culmina con la formación del nódulo (Murray, 2011). El protagonismo de estas moléculas (flavonoides y factores de nodulación) en los inicios de la interacción simbiótica no resta importancia al papel de otras muchas moléculas necesarias para la simbiosis, tales como los polisacáridos de superficie, las proteínas Nop, los AI o las moléculas que IQS bacteriano. Se sabe que la producción de ciertos polisacáridos simbióticamente importantes, así como la síntesis de proteínas Nop están reguladas directa o indirectamente por la proteína NodD1 tras su activación por flavonoides específicos de

los genes de nodulación (Murray, 2011). En esta Tesis, los resultados indican que, además de en todas estas funciones, los flavonoides también podrían estar implicados en el incremento general en la producción de AI y, por lo tanto, podrían potenciar los sistemas de QS de las bacterias simbiotes. De hecho, los sistemas de QS controlan numerosos fenotipos implicados en mayor o menor medida en una simbiosis eficiente, tales como la formación de biofilm, la transferencia de plásmidos, la movilidad o la síntesis de polisacáridos; por lo que no es de extrañar la activación de estos fenotipos en los rizobios en presencia de flavonoides específicos sintetizados por sus plantas hospedadoras.

La rizosfera posee unas condiciones nutricionales que favorecen la proliferación bacteriana, por lo tanto, es un hábitat especialmente favorable para la comunicación celular, ya que la densidad y variedad de bacterias es elevada. De hecho, aproximadamente el 20% de todas las bacterias cultivables presentes en ambientes rizosféricos poseen sistemas de QS (D'Angelo-Picard *et al.*, 2004). Parece evidente por lo tanto que estas poblaciones bacterianas además de tener una comunicación intraespecífica, puedan tener una comunicación interespecífica. De hecho, bacterias poco relacionadas filogenéticamente producen el mismo tipo de moléculas AI, y éstas son capaces tanto de inducir sus propios sistemas de QS, como el de bacterias que posean receptores para estos AI (Steidle *et al.*, 2002). Además, recientemente se ha descubierto que muchos microorganismos tienen genes homólogos al gen *luxR* de *V. fischeri* pero sin poseer el homólogo a *luxI*. De esta forma estas bacterias, independientemente de que tengan o no otros sistemas de QS con los dos genes (homólogos de *luxI* y *luxR*), pueden censar las moléculas autoinductoras producidas por otras bacterias (Subramoni y Venturi, 2009). Por lo tanto, en la rizosfera las diferentes poblaciones bacterianas pueden activar cruzadamente sus sistemas de QS para iniciar la colonización e infección del hospedador, tanto en bacterias patógenas como en bacterias beneficiosas para la planta.

Según Mathesius *et al.* (2003), las plantas pueden detectar AHL a concentraciones muy bajas incrementando la expresión de genes, entre los que predominan los implicados en la respuesta defensiva de plantas. Además, diferentes AHL generan incrementos de expresión de diferentes genes, lo que sugiere que las plantas pueden distinguir entre los diferentes tipos de AI (Mathesius *et al.*, 2003). En este mismo trabajo, además, se comprobó que los tipos y/o la cantidad de moléculas que IQS

producidas por *Medicago truncatula* cambiaba tras la exposición de las raíces de esta planta a AHL. Por ello, las plantas, mediante la producción de moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano, podrían potenciar unos sistemas de QS e inhibir otros de manera más o menos específica.

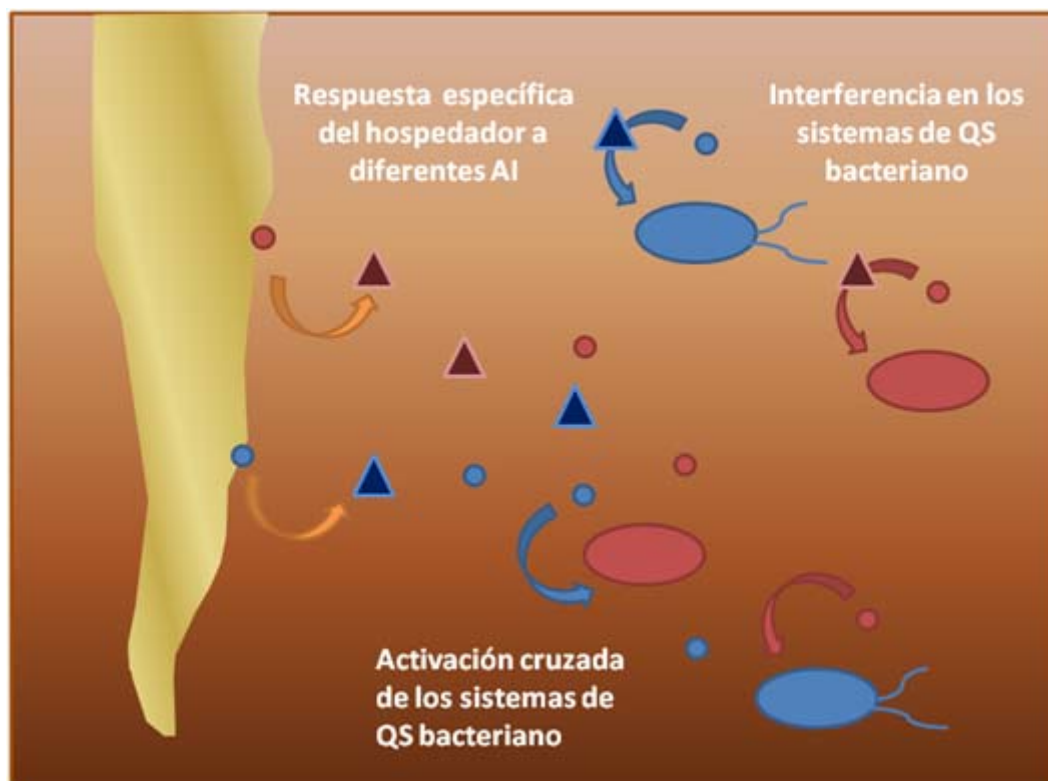


Figura 5.4. Modelo de comunicación celular en la rizosfera. Las bacterias activan sus sistemas de QS mediante la producción de AI, coordinando la activación de fenotipos necesarios para la colonización del hospedador. Además, las bacterias de diferentes especies pueden activar cruzadamente sus sistemas de QS. Por otro lado, la planta puede reconocer específicamente los AI bacterianos y modificar las moléculas que exuda a través de la raíz. Algunas de estas moléculas pueden potenciar o inhibir específicamente los sistemas de QS bacteriano.

Recientemente se ha descrito que, uno de los compuestos exudados por *Combretum albiflorum*, el flavonoide catequina, reduce la producción de factores de virulencia regulados mediante sistemas de QS en la bacteria patógena *P. aeruginosa* PAO1 (Vandeputte *et al.*, 2010). En esta Tesis, sin embargo, se ha demostrado que los flavonoides inductores de los genes de nodulación potencian los sistemas de QS en los tres rizobios analizados. Estos sistemas, al menos en SMH12, parecen estar implicados en la correcta colonización de la raíz de la leguminosa y, de hecho, son necesarios para una simbiosis óptima. Las leguminosas hospedadoras, por lo tanto, podrían de manera

específica activar los sistemas de QS de rizobios compatibles mediante la producción de flavonoides inductores de sus genes de nodulación.

Los estudios de detección e inicio de caracterización de moléculas que interfieren en los sistemas de QS bacteriano realizados en la Tesis parecen indicar que las moléculas producidas por plantas de arroz y judía que interfieren en los sistemas de QS bacteriano no son de tipo AHL y, sin embargo, son capaces de activar o inhibir estos sistemas en diferentes estirpes biosensoras. Por ello, probablemente las plantas produzcan a través de sus exudados varias moléculas capaces de interferir específicamente en los sistemas de QS, potenciando unos e inhibiendo otros, como primera línea de defensa de la planta (Figura 5.4.).

La complejidad de la red de señales que controlan las interacciones entre las plantas y los microorganismos asociados en la rizosfera genera un enorme reto para las futuras investigaciones sobre los sistemas de quorum sensing de los rizobios y la interferencia en estos sistemas por parte de las leguminosas hospedadoras. No se deben estudiar cada una de las señales por separado, puesto que todas están de algún modo conectadas, y únicamente mediante ensayos globales de proteómica, transcriptómica, metabolómica, etc., se podrá comenzar a dilucidar el papel de cada una de estas señales durante la comunicación intercelular que ocurre entre el rizobio y la leguminosa.

CONCLUSIONES

1. *Sinorhizobium fredii* SMH12, *Rhizobium etli* ISP42 y *Rhizobium sülle* IS123 producen como moléculas autoinductoras la C8-HSL y al menos uno de sus derivados oxo- o hidrox-. SMH12 y ISP42 producen además la C14-HSL y la 3-oxo-C14-HSL, respectivamente.
2. *S. fredii* SMH12 posee al menos tres genes de síntesis de AHL: *traI*, implicado en la síntesis de la 3-oxo-C8-HSL, *traI(2)* y *sinI*. *R. etli* ISP42 posee al menos dos genes de síntesis de AHL: *rail*, implicado en la síntesis de la C8-HSL y la 3-OH-C8-HSL; y *cinI*.
3. Los genes de nodulación de SMH12 son inducidos por un amplio rango de flavonoides. En el extremo opuesto se encuentra IS123, cuyos genes de nodulación se inducen por un bajo número de flavonoides; mientras que en ISP42 encontramos un caso intermedio.
4. Los flavonoides inductores de los genes de nodulación, genisteína en *S. fredii* SMH12, apigenina en *R. etli* ISP42 y daidzeína en *R. sullae* IS123 incrementan la producción total de autoinductores y la expresión de sus genes de síntesis: *traI* de SMH12 y *rail* y *cinI* de ISP42. Este efecto no se observa en presencia de flavonoides no inductores de los genes de nodulación (umbeliferona para SMH12 e ISP42 y apigenina para IS123).
5. El incremento de expresión del gen *traI* de *S. fredii* SMH12 por genisteína es dependiente de la presencia de AHL. NodD1 reprime la expresión del gen *traI* en SMH12. Además, en presencia del flavonoide inductor de los genes de nodulación, NodD1 deja de reprimir la expresión del gen *traI*.
6. La capacidad de nodulación de la soja cv Osumi por *S. fredii* SMH12 se ve disminuida por la reducción en la producción de AHL por esta bacteria.
7. La reducción en la producción de AHL por SMH12 no altera la producción de otras moléculas bacterianas importantes para la simbiosis, como los EPS, LPS y proteínas Nop.

8. La presencia de la genisteína en cultivos determina que el biofilm que desarrolla *S. fredii* SMH12 cambie del tipo monocapa a tipo microcolonia. Esta transición es dependiente de la producción de AHL.

9. La correcta y eficiente colonización de la raíz de la soja cv Osumi por *S. fredii* SMH12 depende de la producción de AHL.

10. Las plantas de arroz cv Puntal y judía cv BBL producen al menos un tipo de molécula que interfiere en los sistemas de QS bacterianos. Estas moléculas no son de tipo *N*-acil homoserina lactonas. Además, las semillas de arroz contienen una molécula adicional con características de las AHL.

BIBLIOGRAFÍA

- Aendekerk S, Ghysels B, Cornelis P, Baysse C.** 2002. Characterization of a new efflux pump, MexGHI-OpmD, from *Pseudomonas aeruginosa* that confers resistance to vanadium. *Microbiology*. **148**:2371-2381.
- Adonizio A, Kong KF, Mathee K.** 2008. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* by South Florida plant extracts. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:198-203.
- Alt-Mörbe J, Stryker JL, Fuqua C, Li PL, Farrand SK, Winans SC.** 1996. The conjugal transfer system of *Agrobacterium tumefaciens* octopine-type Ti plasmids is closely related to the transfer system of an IncP plasmid and distantly related to Ti plasmid vir genes. *J Bacteriol.* **178**:4248-57.
- Anderson RA, Eriksson AR, Heikinheimo R, Mae A, Pirhonen M, Koiv V, Hyytiäinen H, Tuikkala A, Palva ET.** 2000. Quorum-sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: The role of *expR* (Ecc). *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**:384-93.
- Ballantine JA, Beer RJS, Crutchley DJ, Dodd GM, Palmer DR.** 1958. The synthesis of violacein and related compounds. *Proc. Chem. Soc.* 232-233.
- Bassler BL.** 1999. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**:582-587.
- Bassler BL.** 2002. Small talk. Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.* **109**:421-424.
- Bassler BL, Wright M, Showalter RE, Silverman MR.** 1993. Intercellular signalling in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes regulating expression of luminescence. *Mol. Microbiol.* **9**:773-786.

Bassler BL, Wright M, Silverman MR. 1994. Multiple signalling systems controlling expression of luminescence in *Vibrio harveyi*: sequence and function of genes encoding a second sensory pathway. *Mol. Microbiol.* **13**:273-286.

Beck von Bodman S, Farrand SK. 1995. Capsular polysaccharide biosynthesis and pathogenicity in *Erwinia stewartii* require induction by an *N*-acyl homoserine lactone autoinducer. *J. Bacteriol.* **177**:5000-5008

Beck von Bodman S, Majerczak DR, Coplin DL. 1998. A negative regulator mediates quorum-sensing control of exopolysaccharide production in *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**:7687-7692.

Becker A, Schmidt M, Jager W, Puhler A. 1995. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene.* **162**: 37-39.

Behringer JE. 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.

Bjarnsholt T, Jensen PØ, Rasmussen TB, Christophersen L, Calum H, Hentzer M, Hougen HP, Rygaard J, Moser C, Eberl L, Høiby N, Givskov M. 2005. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology.* **151**:3873-80.

Bogdanove AJ, Beer SV, Bonas U, Boucher CA, Collmer A, Coplin DL, Cornelis GR, Huang HC, Hutcheson SW, Panopoulos NJ, Van Gijsegem F. 1996. Unified nomenclature for broadly conserved *hrp* genes of phytopathogenic bacteria. *Mol. Microbiol.* **20**:681-683.

Bolton HJ, Fredrikson G, Elliot LE. 1992. Microbial ecology of the rhizosphere, pp. 27-63. En *Soil microbial ecology*. Editor: F.B. Metting Jr. Marcel Dekker, Inc., Nueva York (EEUU).

- Brelles-Marino G, Bedmar, EJ.** 2001 Detection, purification and characterisation of quorum-sensing signal molecules in plant-associated bacteria. *J. Biotechnol.* **91**:197-209.
- Broughton WJ, Jabbouri S. Perret X.** 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**:5641-5652.
- Campbell J, Lin Q, Geske GD, Blackwell HE.** 2011. New and unexpected insights into the modulation of LuxR-type quorum sensing by cyclic dipeptides. *ACS Chemical Biology.* **4**:1051-1059.
- Cataldi TRI, Bianco G, Abate S, Mattia D.** 2009. Analysis of *S*-adenosylmethionine and related sulfur metabolites in bacterial isolates of *Pseudomonas aeruginosa* (BAA-47) by liquid chromatography/electrospray ionization coupled to a hybrid linear quadrupole ion trap and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Sp.* **23**:3465-3477.
- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK.** 1998. Production of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by gram-negative plant-associated bacteria. *Mol.Plant-Microbe Interact.* **11**:1119-1129.
- Chai Y, Zhu J, Winans SC.** 2001. TrlR, a defective TraR-like protein of *Agrobacterium tumefaciens*, blocks TraR function *in vitro* by forming inactive TrlR:TraR dimers. *Mol. Microbiol.* **40**:414-421.
- Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM.** 2002. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature.* **415**:545-549.
- Chen G, Malenkos JW, Cha MR, Fuqua C, Chen L.** 2004. Quorum-sensing antiactivator TraM forms a dimer that dissociates to inhibit TraR. *Mol. Microbiol.* **52**:1641-1651.

- Chugani SA, Whiteley M, Lee KM, D'Argenio D, Manoil C, Greenber EP.** 2001. QscR, a modulator of quorum-sensing signal synthesis and virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:2752-2757.
- Chung C, Niemela SL, Miller RH.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **6**:2172-2175.
- Costa JM, Loper JE.** 1997. EcbI and EcbR: homologs of LuxI and LuxR affecting antibiotic and exoenzyme production by *Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum*. *Can. J. Microbiol.* **43**:1164-1171.
- Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM.** 1995. Microbial biofilm. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**:711-745.
- Crespi M, Galvez S.** 2000. Molecular mechanism in root nodule development. *J. Plant Growth Regul.* **19**:155-166.
- Cubo MT, Economou A, Murphy G, Johnston AW, Downie JA.** 1992. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhiABCR* that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* **174**:4026-4035.
- D'Angelo-Picard C, Faure D, Carlier A, Uroz S, Raffoux A, Fray R, Dessaux Y.** 2004. Bacterial populations in the rhizosphere of tobacco plants producing the quorum-sensing signals hexanoyl-homoserine lactone and 3-oxo-hexanoyl-homoserine lactone. *FEMS Microbiol Ecol.* **51**:19-29.
- D'Haeze W, Holsters M.** 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology.* **12**:79-105.

Daniels R, De Vos DE, Desair J, Raedschelders G, Luyten E, Rosemeyer V, Verreth C, Schoeters E, Vanderleyden J, Michiels J. 2002. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* **277**:462-468.

Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J. 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**:261-289.

Danino VE, Wilkinson A, Edwards A, Downie, JA. 2003. Recipient-induced transfer of the symbiotic plasmid pRL1JI in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is regulated by a quorum-sensing relay. *Mol. Microbiol.* **50**:511-525.

Dardanelli MS, Fernández de Córdoba FJ, Espuny MR, Rodríguez-Carvajal MA, Soria-Díaz ME, Gil-Serrano AM, Okon Y, Megías M. 2008. Effect of *Azospirillum brasilense* coinoculated with *Rhizobium* on *Phaseolus vulgaris* flavonoids and Nod factor production under salt stress. *Soil Biol. Biochem.* **40**:2713-2721.

Dardanelli MS, Manyani H, González-Barroso S, Rodríguez-Carvajal MA, Gil-Serrano A, Espuny MR, López-Baena FJ, Bellogín RA, Megías M, Ollero FJ. 2010. Effect of the presence of the plant growth promoting rhizobacterium (PGPR) *Chryseobacterium balustinum* Aur9 and salt stress in the pattern of flavonoids exuded by soybean roots. *Plant Soil.* **328**:483-493.

Day WA Jr, Maurelli AT. 2001. *Shigella flexneri* LuxS quorum-sensing system modulates virB expression but is not essential for virulence. *Infect. Immun.* **69**:15-23.

de Lyra M CCP, López-Baena FJ, Madinabeitia N, Vinardell JM, Espuny MR, Cubo MT, Bellogín RA, Ruiz-Sainz JE, Ollero FJ. 2006. Inactivation of the *Sinorhizobium fredii* HH103 *rhcJ* gene abolishes nodulation outer proteins (Nops) secretion and decreases the symbiotic capacity with soybean. *Int. Microbiol.* **9**:125-133.

- De Maagd RA, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ.** 1988. Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. J. Bacteriol. **170**:4424-4427.
- Deakin WJ, Broughton WJ.** 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. Nat Rev Microbiol. **7**:312-320.
- Degrassi G, Devescovi G, Solis R, Steindler L, Venturi V.** 2007. *Oryza sativa* rice plants contain molecules that activate different quorum-sensing *N*-acyl homoserine lactone biosensors and are sensitive to the specific AiiA lactonase. FEMS Microbiol. Lett. **269**:213-220.
- Dolan KM, Greenberg EP.** 1992. Evidence that GroEL, not sigma 32, is involved in transcriptional regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **174**:5132-5135.
- Downie JA.** 1998. Function of rhizobial nodulation genes, pp. 387-402. En *The Rhizobiaceae*. Editores: HP Spaink, A Kondorosi, PJJ Hooykaas. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Holanda).
- Dubern JF, Diggle SP.** 2008. Quorum sensing by 2-alkyl-4-quinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and other species. Mol. Biosyst. **4**:882-888.
- Dunlap PV, Greenberg EP.** 1995. Control of *Vibrio fischeri* luminescence gene expression in *Escherichia coli* by cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. J. Bacteriol. **164**:45-50.
- Eberhard A, Burlingame AL, Eberhard C, Kenyon GL, Nealson KH, Oppenheimer NJ.** 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. Biochemistry. **20**:2444-2449.

Engebrecht J, Silverman M. 1984. Identification of genes and products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**:4154-4158.

Engebrecht J, Silverman M. 1987. Nucleotide sequence of the regulatory locus controlling expression of bacterial genes for bioluminescence. *Nucleic. Acids. Res.* **15**:10455-10467.

Escobar MA, Dandekar AM. 2003. *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci.* **8**:380-6.

Espuny MR, Ollero FJ, Bellogín RA, Ruiz-Sainz JE, Perez-Silva J. 1987. Transfer of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* symbiotic plasmid pRtr5a to a strain of *Rhizobium* sp. that nodulates on *Hedysarum coronarium*. *J. Appl. Microbiol.* **63**:13-20.

Farrand SK, Qin Y, Oger P. 2002. Quorum sensing systems of *Agrobacterium* plasmids: analysis and utility. *Methods. Enzymol.* **358**:452-484.

Ferguson BJ, Indrasumunar A, Hayashi S, Lin MH, Lin YH, Reid DE, Gresshoff PM. 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* **52**:61-76.

Figurski DH, Helinski DR. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:1648-1652.

Fischer HM. 1996. Environmental regulation of rhizobial symbiotic nitrogen fixation genes. *Trends Microbiol.* **4**:317-320.

Frayse N, Couderc F, Poinso V. 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**:1365-1380.

Freiberg C, Rémy F, Bairoch A, Broughton WJ, Rosenthal A, Perret, X. 1997. Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*. **387**:394-401.

Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-275.

Fuqua C, Parsek MR, Greenberg EP. 2001. Regulation of gene expression by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing. *Annu. Rev. Genet.* **35**:439-468.

Fujishige NA, Lum MR, De Hoff PL, Whitelegge JP, Faull KF, Hirsch AM. 2006. *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **67**:504-15.

Gage DJ. 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:280-300.

Gao M, Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. 2003. Production of substances by *Medicago trunculata* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:827-834.

Gao M, Chen H, Eberhard A, Gronquist MR, Robinson JB, Rolfe BG, Bauer WD. 2005. *sinI* and *expR*-dependent quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **187**:7931-7944.

Gao M, Teplitski M. 2008. RIVET-a tool for in vivo analysis of symbiotically relevant gene expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **21**:162-70.

Geurts R, Bisseling T. 2002. *Rhizobium* Nod factor perception and signalling. *Plant Cell supplement* 2002:S239-S249.

Gilbert P, Das J, Foley I. 1997. Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.* **11**:160–167.

Göttfert M, Rothlisberger S, Kundig C, Beck C, Marty R, Hennecke, H. 2001. Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.* **183**:1405-1412.

Gonzalez JE, Marketon MM. 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**:574-592.

Gonzalez JE, Keshavan ND. 2006. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:859-875.

Györgypal Z, Kondorosi A. 1991. Homology of the ligand-binding regions of *Rhizobium* symbiotic regulatory protein NodD and vertebrate nuclear receptors. **226**:337-340.

Györgypal Z, Kiss GB, Kondorosi A. 1991. Transduction of plant signal molecules by the *Rhizobium* NodD proteins. *Bioessays*. **13**:575-81. Review.

Hanin M, Jabbouri S, Broughton WJ, Fellay R. 1998. SyrM1 of *Rhizobium* sp. NGR234 activates the transcription of symbiotic loci and controls the level of sulphated Nod factors. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**:343-350.

Hanzelka BL, Parsek MR, Val DL, Dunlap PV, Cronan JE, Jr., Greenberg EP. 1999. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* **181**:5766-5770.

Harborne JB, Williams CA. 2001. Anthocyanins and other flavonoids. *Nat. Prod. Rep.* **18**:310-333.

Hardman AM, Stewart GS, Williams P. 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of the gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. **74**:199-210.

He X, Chang, W, Pierce DL, Seib LO, Wagner J, Fuqua C. 2003. Quorum sensing in *Rhizobium* sp. strain NGR234 regulates conjugal transfer (*tra*) gene expression and influences growth rate. *J. Bacteriol.* **185**:809-822.

Henke JM, Bassler BL. 2004. Three parallel quorum-sensing systems regulate gene expression in *Vibrio harveyi*. *J. Bacteriol.* **186**:6902-6914.

Hilgers MT, Ludwig ML. 2001. Crystal structure of the quorum-sensing protein LuxS reveals a catalytic metal site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:11169-11174.

Hirsch AM. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**:320-326.

Holden MT, Ram-Chhabra S, de Nys R, Stead P, Bainton NJ, Hill PJ, Manefield M, Kumar N, Labatte M, England D, Rice S, Givskov M, Salmond GP, Steward S, Bycroft BW, Kjelleberg, Williams P. 1999. Quorum sensing cross-talk: isolation and chemical characterization of cyclic dipeptides from *Pseudomonas aeruginosa* and other gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **33**:1254-1266.

Howieson JG, O'Hara GW, Carr SJ. 2000. Changing roles for legumes in Mediterranean agriculture: developments from an Australian perspective. *Fields Crop Res.* **65**: 107-122.

Huang JJ, Han JI, Zhang LH, Leadbetter JR. 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5941-5949.

Hueck, CJ. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:379-433.

Hungria M, Joseph CM, Phillips DA. 1991a. *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**:759-764.

Hungria M, Joseph CM, Phillips DA. 1991b. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**:751-758.

Hwang I, Smyth AJ, Luo ZQ, Farrand SK. 1999. Modulating quorum sensing by antiactivation: TraM interacts with TraR to inhibit activation of Ti plasmid conjugal transfer genes. *Mol. Microbiol.* **34**:282-294.

Jitksorn S, Sadowsky M. 2008. Nodulation gene regulation and quorum sensing control density-dependent suppression and restriction of nodulation in *Bradyrhizobium japoanicum*–soybean symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:3749-3756.

Kahn ML, McDermott TR, Udvardi MK. 1998. Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia, pp. 417-429. En *The Rhizobiaceae*. Editores: HP Spaink, A Kondorosi y PJJ Hooykaas. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (Holanda).

Kaneko T, Nakamura Y, Sato S, Asamizu E, Kato T, Sasamoto S, Watanabe A, Idesawa K, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kiyokawa C, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Mochizuki Y, Nakayama S, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takeuchi C, Yamada M, Tabata S. 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* **7**:331-338.

Keshavan ND, Chowdhary PK, Haines DC, González JE. 2005. L-Canavanine made by *Medicago sativa* interferes with quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **187**:8427-8436.

- Khan SR, Mavrodi DV, Jog GJ, Suga H, Thomashow LS, Farrand SK.** 2005. Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a cis-acting *phz* box. *J. Bacteriol.* **187**:6517-6527.
- Kondorosi E, Pierre M, Cren M, Haumann U, Buiré M, Hoffmann B, Schell J, Kondorosi A.** 1991. Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**:885-896.
- Kondorosi E, Kondorosi A.** 2004. Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* **567**:152-157.
- Köplin R, Wang G, Hotte B, Priefer UB, Pühler A.** 1993 A 3.9-kb DNA region of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* that is necessary for lipopolysaccharide production encodes a set of enzymes involved in the synthesis of dTDP-rhamnose. *J. Bacteriol.* **175**:7786-7792.
- Kovach ME, Elzer PH, Hill DS, Robertson GT, Farris MA, Roop RM 2nd, Peterson KM.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene.* **166**:175-176.
- Krishnan HB, Pueppke SG.** 1993. Flavonoid inducers of nodulation genes stimulate *Rhizobium fredii* USDA257 to export proteins into the environment. *Mol. Plant-Microbe Interact* **6**: 107-113.
- Krishnan HB, Lorio J, Kim WS, Jiang G, Kim KY, DeBoer M, Pueppke SG.** 2003. Extracellular proteins involved in soybean cultivar specific nodulation are associated with pilus-like appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**:617-625.
- Labbate M, Queck SY, Koh KS, Rice SA, Givskov M, Kjelleber S.** 2004. Quorum sensing-controlled biofilm development in *Serratia liquefaciens* MG1. *J. Bacteriol.* **186**:692-698.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-685.

Laue BE, Jiang Y, Chhabra SR, Jacob S, Steward GS, Harmand A, Downie JA, O’Gara F, Williams P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cys-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology*. **146**:2469-2480.

Laus MC, Logman TJ, Lamers GE, van Brusel AAN, Carlson R, Kijne JW. 2006. A novel polar surface polysaccharide from *Rhizobium leguminosarum* binds host plant lectin. *Mol. Microbiol.* **59**:1704-1713.

Leadbetter JR, Greenberg EP. 2000. Metabolism of acyl-homoserine lactone quorum-sensing signals by *Variovorax paradoxus*. *J. Bacteriol.* **182**:6921-6926.

Ledgham F, Ventre I, Soscia C, Foglino M, Sturgis JN, Lazdunski A. 2003. Interaction of the quorum sensing regulator QscR: interaction with itself and the other regulators of *Pseudomonas aeruginosa* LasR and RhlR. *Mol. Microbiol.* **48**:199-210.

Lee JH, Lequette Y, Greenberg EP. 2006. Activity of purified QscR, a *Pseudomonas aeruginosa* orphan quorum-sensing transcription factor. *Mol. Microbiol.* **59**:602-609.

Lenz DH, Mok KC, Lilley BN, Kulkarni RV, Wingreen NS, Bassler BL. 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell*. **118**:69-82.

Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé JC, Dénarié J. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. **344**:781-784.

- Lewenza S, Conway B, Greenberg EP, Sokol PA.** 1999. Quorum sensing in *Burkholderia cepacia*: identification of the LuxRI homologs CepRI. J. Bacteriol. **181**:748-756.
- Lewis HA, Furlong EB, Laubert B, Eroshkina GA, Batiyenko Y, Adams JM, Bergseid MG, Marsh CD, Peat TS, Sanderson WE, Sauder JM, Buchanan SG.** 2001. A structural genomics approach to the study of quorum sensing: crystal structures of three LuxS orthologs. Structure. **9**:527-537.
- Li YH, Tang N, Aspiras MB, Lau PC, Lee JH, Ellen RP, Cvitkovitch DG.** 2002. A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. J. Bacteriol. **184**:2699-2708.
- Lin YH, Xu JL, Hu J, Wang LH, Ong SL, Leadbetter JR, Zhang LH.** 2003. Acyl-homoserine lactone acylase from *Rastonia* strain XJ12B represents a novel and potent class of quorum-quenching enzymes. Mol. Microbiol. **47**:849-860.
- Lindemann A, Pessi G, Schaefer AL, Mattman ME, Christensen QH, Kessler A, Hennecke H, Blackwell H, Greenberg EP, Harwood CS.** 2011. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **108**:16765-16770.
- Lithgow JK, Wilkinson A, Hardman A, Rodelas B, Wisniewski-Dye F, Williams P, Downie JA.** 2000. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. Mol. Microbiol. **37**:81-97.
- Loh J, Carlson RW, York WS, Stacey G.** 2002. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **99**:14446-14451.
- Loh J, Stacey G.** 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. Appl. Environ. Microbiol. **69**:10-17.

Lopez-Baena FJ, Monreal JA, Pérez-Montano F, Guasch-Vidal B, Bellogín RA, Vinardell JM, Ollero FJ. 2009. The absence of Nops secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103 increases *GmPRL* expression in Williams soybean. *Mol. Plant Microbe-Interact.* **22**:1445-1454.

Lopez-Baena FJ, Vinardell JM, Pérez-Montano F, Crespo-Rivas JC, Bellogín RA, Espuny MR, Ollero FJ. 2008. Regulation and symbiotic significance of nodulation outer proteins secretion in *Sinorhizobium fredii* HH103. *Microbiology.* **154**:1825-1836.

Luo ZQ, Qin Y, Farrand SK. 2000. The antiactivator TraM interferes with the autoinducer-dependent binding of TraR to DNA by interacting with the C-terminal region of the quorum-sensing activator. *J. Biol. Chem.* **275**:7713-7722.

Makemson J, Eberhard A. Mathee K. 2006. Simple electrospray mass spectrometry detection of acylhomoserine lactones. *Luminescence.* **21**:1-6.

Manefield M, de Nys R, Kumar N, Read R, Givskov M, Steinberg P, Kjelleberg S. 1999. Evidence that halogenated furanones from *Delisea pulchra* inhibit acylated homoserine lactone (AHL)-mediated gene expression by displacing the AHL signal from its receptor protein. *Microbiology.* **145**:283-91.

Manefield M, Rasmussen TB, Henzter M, Andersen JB, Steinberg P, Kjelleberg S, Givskov M. 2002. Halogenated furanones inhibit quorum sensing through accelerated LuxR turnover. *Microbiology.* **148**:1119-1127.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. 1982. En *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).

Marketon MM, Gronquist MR, Eberhard A, Gonzalez JE. 2002. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J. Bacteriol.* **184**:5686-5695.

- Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, Gonzalez JE.** 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. J. Bacteriol. **185**:325-331.
- Masson-Boivin C, Giraud E, Perret X, Batut J.** 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many rhizobium recipes? Trends Microbiol. **17**:458-466.
- Mathesius U, Imin N, Chen H, Djordjevic MA, Weinman JJ, Natera SH, Morris AC, Kerim T, Paul S, Menzel C, Weiller GF, Rolfe BG.** 2003. Evaluation of proteome reference maps for cross-species identification of proteins by peptide mass fingerprinting. Proteomics. **2**:1288-1303.
- McClellan KH, Winson MK, Fish L, Taylor A, Chhabra SR, Camara M, Daykin M, Lamb JH, Swift S, Bycroft BW, Stewart GS, Williams P.** 1997. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. Microbiology. **143**:3703-3711.
- McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS, Lamont RJ.** 2003. LuxS-based signalling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 control carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. **185**:274-284.
- Merritt PM, Danhorn T, Fuqua C.** 2007. Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. J. Bacteriology. **189**:8005-8014.
- Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, Nueva York (EEUU).
- Miller ST, Xavier XB, Campagna SR, Taga ME, Semmelhack MF, Bassler BL, Hughson FM.** 2004. *Salmonella typhimurium* recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. Mol. Cell. **15**:677-687.

- Minami E, Kouchi H, Carlson RW, Cohn JR, Kolli VK, Day RB, Ogawa T, Stacey G.** 1996. Cooperative action of lipo-chitin nodulations signals on the induction of the early nodulin, ENOD2, in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:574-583.
- Mithöfer, A.** 2002. Suppression of plant defense in rhizobia-legume symbiosis. *Trends Plant Sci.* **7**:440-444.
- Mok KC, Wingreen NS, Bassler BL.** 2003. *Vibrio harveyi* quorum sensing: a coincident detector for two autoinducers controls gene expression. *EMBO J.* **22**:870-881.
- Morin D, Grasland B, Vallee-Rehel K, Dufau C, Haras D.** 2003. On-line high-performance liquid chromatography-mass spectrometric detection and quantification of *N*-acylhomoserine lactones, quorum sensing signal molecules, in the presence of biological matrices. *J. Chromatogr.* **1002**:79-92.
- Mueller K, Gonzalez JE.** 2011. Complex regulation of symbiotic functions is coordinated by mucR and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **193**:485-496.
- Murray JD.** 2011. Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**:631-639.
- Nealson KH, Platt T, Hastings JW.** 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* **104**:313-322.
- Nealson KH, Hastings JW.** 1970. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol. Rev.* **43**:496-518.
- Oger P, Farrand SK.** 2001. Co-evolution of the agrocinopine opines and the agrocinopine-mediated control of TraR, the quorum-sensing activator of the Ti plasmid conjugation system. *Mol. Microbiol.* **41**:1173-1185.

- Oger P, Farrand SK.** 2002. Two opines control conjugal transfer of an *Agrobacterium* plasmid by regulating expression of separate copies of the quorum-sensing activator gene *traR*. *J. Bacteriol.* **184**:1121-1131.
- Ortori CA, Atkinson S, Chhabra SR, Camara M, Williams P, Barrett DA.** 2007. Comprehensive profiling of *N*-acylhomoserine lactones produced by *Yersinia pseudotuberculosis* using liquid chromatography coupled to hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**:497-511.
- Patriarca EJ, Tatè R, Ferraioli S, Iaccarino M.** 2004. Organogenesis of the legume root nodules. *Int. Rev. Citol.* **234**: 201-262.
- Parniske M, Downie JA.** 2003. Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature.* **425**:569-570.
- Pearson JP, Van Delden C, Iglewski BH.** 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**:1203-1210.
- Peck MC, Fisher RF, Long SR.** 2006. Diverse flavonoids stimulate NodD1 binding to *nod* gene promoters in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **188**:5417-5427.
- Pellock BJ, Teplitski M, Boinay RP, Bauer WD, Walker GC.** 2002. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriology.* **184**:5067-5076.
- Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, González-Barroso S, López-Baena FJ, Cubo T, Ollero FJ, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MA, Bellogín RA, Espuny MR.** 2011. Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of *N*-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Res. Microbiol.* **162**:715-23.

- Perret X, Stachelin C, Broughton WJ.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Piper KR, Beck von Bodman S, Farrand, SK.** 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature.* **362**:448-450.
- Piper KR, Beck Von Bodman B, Hwang I, Farrand SK.** 1999. Hierarchical gene regulatory systems arising from fortuitous gene associations: controlling quorum sensing by the opine regulon in *Agrobacterium*. *Mol. Microbiol.* **32**:1077-1089.
- Piper KR, Farrand SK.** 2000. Quorum sensing but not autoinduction of Ti plasmid conjugal transfer requires control by the opine regulon and the antiactivator TraM. *J. Bacteriol.* **182**:1080-1088.
- Prentki P, Krisch HM.** 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene.* **29**:303-313.
- Pueppke SG, Bolaños-Vásquez MC, Werner D, Bec-Ferté MP, Promé JC, Krishnan HB.** 1998. Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their perception as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiol.* **117**:599-606.
- Rasmussen TB, Bjarnsholt T, Skindersoe ME, Hentzer M, Kristoffersen P, Kote M, Nielsen J, Eberl L, Givskov M.** 2005. Screening for quorum-sensing inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J. Bacteriol.* **187**:1799-1814.
- Reading NC, Sperandio V.** 2006. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:1-11.
- Reimann C, Ginet N, Michel L, Keel C, Michaux P, Krishnapillai V, Zala M, Heurlier K, Triandafillu K, Harms H, Défago G, Haas D.** 2002. Genetically

programmed autoinducer destruction reduces virulence gene expression and swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Microbiology. **148**:923-32.

Ren D., Sims JJ, Wood TK. 2001. Inhibition of biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. Environ. Microbiol. **3**:731-736.

Ren D, Zuo R, Gonzalez-Barrios AF, Bedzyk LA, Eldridge GR, Pasmore ME, Wood TK. 2005. Differential gene expression for investigation of *Escherichia coli* biofilm inhibition by plant extract ursolic acid. Appl. Environ. Microbiol. **71**:4022-4034.

Rinaudi LV, Giordano W. 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. FEMS Microbiol. Lett. **304**:1-11.

Rigaud J, Puppo A. 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. J. of Gen. Microbiol. **88**:223-8.

Rodelas B, Lithgow JK, Wisniewski-Dye F, Hardman A, Wilkinson A, Economou A, Williams P, Downie JA. 1999. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. J. Bacteriol. **181**:3816-3823.

Rodriguez-Navarro DN, Bellogín R, Camacho M, Daza A, Medina C, Ollero FJ, Santamaria C, Ruiz-Sainz JE, Vinardell JM, Temprano FJ. 2003. Field assessment and genetic stability of *Sinorhizobium fredii* strain SMH12 for commercial soybean inoculants. Eur. J. Agron. **19**:299-309.

Rodriguez-Navarro DN, Buendia AM, Camacho M, Lucas MM, Santamaria C. 2000. Characterization of *Rhizobium* spp. bean isolates from South-West Spain. Soil Biol. Biochem. **32**:1601-1613.

- Rodríguez-Navarro DN, Dardanelli M, Ruiz-Sainz JE.** 2007. Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS Microbiol. Lett.* **272**:127-136.
- Rosemeyer V, Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J.** 1998. *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J. Bacteriol.* **180**:815-821.
- Rosenthal, GA.** 2001. L-Canavanine: a higher plant insecticidal allelochemical. *Amino Acids.* **21**:319-330.
- Ruzheinikov SN, Das SK, Sedelnikova SE, Hartley A, Foster SJ, Horsburgh MJ, Cox AG, McCleod CW, Mekhalfia A, Blackburn GM, Rice DW, Baker PJ.** 2001. The 1.2 Å structure of a novel quorum-sensing protein, *Bacillus subtilis* LuxS. *J. Mol. Biol.* **313**:111-122.
- Saiki RK.** 1990. Amplification of genomic DNA. En *PCR Protocols. A guide of methods and applications*, pp. 13-20. Editores: M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky y T. J. White. Academic Press Inc., San Diego, California (EEUU).
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanchez-Contreras M, Bauer WD, Gao M, Robinson JB, Allan Downie J.** 2007. Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **362**:1149-1163.
- Schaerfer AL, Greenberg EP, Oliver CM, Oda Y, Huang JJ, Bittan-Banin G, Peres CM, Schmidt S, Juhaszova K, Sufrin JR, Harwood CS.** 2008. A new class of homoserine lactone quorum-sensing signals. *Nature.* **454**:595-600.
- Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids

pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. **145**:69-73.

Schmeisser C, Liesegang H, Krysciak D, Bakkou N, Le Quéré A, Wollherr A, Heinemeyer I, Morgenstern B, Pommerening-Röser A, Flores M, Palacios R, Brenner S, Gottschalk G, Schmitz RA, Broughton WJ, Perret X, Strittmatter AW, Streit WR. 2009. *Rhizobium* sp. strain NGR234 possesses a remarkable number of secretion systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**:4035-4045.

Sircilli MP, Walters M, Trabulsi LR, Sperandio V. 2004. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect. Immun.* **72**:2329-2337.

Somers E, Vanderleyden J, Srinivasan M. 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**:205-40.

Soto MJ, Sanjuán J, Olivares J. 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology.* **152**:3167-3174.

Southern EM. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503-517.

Spaink HP, Okker RJ, Wijffelman CA, Pees E, Lugtemberg BJJ. 1987. Promoters of the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Mol. Biol.* **9**:27-39.

Spaink HP, Wijffjes AHM, Lugtenberg BJJ. 1995. *Rhizobium* NodI and NodJ play a role in the efficiency of secretion of lipochitin oligo-saccharides. *J. Bacteriol.* **177**:6279-6281.

Spaink HP. 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:257-288.

- Sperandio V, Mellies JL, Nguyen W, Shin S, Kaper JB.** 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**:15196-15201.
- Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB.** 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**:8951-8956.
- Stanley NR, Lazazzera BA.** 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **52**:917-924.
- Steidle A, Allesen-Holm M, Riedel K, Berg G, Givskov M, Molin S, Eberl L.** 2002. Identification and characterization of an *N*-acylhomoserine lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:6371-6382.
- Stevens AM, Dolan KM, Greenberg EP.** 1994. Synergistic binding of the *Vibrio fischeri* LuxR transcriptional activator domain and RNA polymerase to the *lux* promoter region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **91**:12619-12623.
- Stevens AM, Fujita N, Ishihama A, Greenberg EP.** 1999. Involvement of the RNA polymerase alpha-subunit C-terminal domain in LuxR-dependent activation of the *Vibrio fischeri* luminescence genes. *J. Bacteriol.* **181**:4704-4707.
- Stevens AM, Greenberg EP.** 1997. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: essential elements for activation of the luminescence genes. *J. Bacteriol.* **179**:557-562.
- Straight PD, Kolter R.** 2009. Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**:99-118.

Stuurman N, Pacios Bras C, Schlaman HR, Wijfjes AH, Bloemberg G, Spaink HP. 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol. Plant Microbe-Interact.* **13**:1163-1169.

Subramoni S, Venturi V. 2009. LuxR-family 'solos': bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology.* **155**:1377-1385.

Surette MG, Miller MB, Bassler BL. 1998. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of gene responsible for autoinducer production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**:1639-1644.

Sutherland IW. 2001. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology.* **147**:3-9.

Swiderska A, Berndtson AK, Cha MR, Li L, Beaudoin III GM, Zhu J, Fuqua C. 2001. Inhibition of the *Agrobacterium tumefaciens* TraR quorum-sensing regulator. Interactions with the TraM anti-activator. *J. Biol. Chem.* **276**:49449-49458.

Swift S, Karlyshev AV, Fish L, Durant EL, Winson MK, Chhabra SR, Williams P, Macintyre S, Stewart GS. 1997. Quorum sensing in *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas salmonicida*: identification of the LuxRI homologs AhyRI and AsaRI and their cognate *N*-acylhomoserine lactone signal molecules. *J. Bacteriol.* **179**:5271-5281.

Tan Z, Hurek T, Gyaneshwar P, Ladha JK, Reinhold-Hurek B. 2001. Novel endophytes of rice form a taxonomically distinct subgroup of *Serratia marcescens*. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**:245–251.

Teplitski M, Robinson JB, Bauer WD. 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol- Plant-Microbe Interact.* **13**:637-648.

Teplitski M, Chen H, Rajamani S, Gao M, Merighi M, Sayre RT, Robinson JB, Rolfe BG, Bauer WD. 2004. *Chlamydomonas reinhardtii* secretes compounds that mimic bacterial signals and interfere with quorum sensing regulation in bacteria. *Plant Physiol.* **134**:137-146.

Thiel V, Kunze B, Verma P, Wagner-Döbler I, Schulz S. 2009. New structural variants of homoserine lactones in bacteria. *Chembiochem.* **10**:1861-1868.

Thorne SH, Williams HD. 1999. Cell densitydependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*: identification of the role of an N-acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* **181**:981-990.

Throup JP, Camara M, Briggs GS, Winson MK, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GS. 1995. Characterisation of the *yenI/yenR* locus from *Yersinia enterocolitica* mediating the synthesis of two N-acylhomoserine lactone signal molecules. *Mol. Microbiol.* **17**:345-356.

Tibe O, Meagher LP, Fraser K, Harding DR. 2011. Condensed tannins and flavonoids from the forage legume sulla (*Hedysarum coronarium*). *J. Agric. Food Chem.* **59**:9402-9409.

Tun-Garrido C, Bustos P, Gonzalez V, Brom S. 2003. Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J. Bacteriol.* **185**:1681-1692.

Uroz S, Chhabra SR, Camara M, Williams P, Oger P, Dessaux Y. 2005. N-Acylhomoserine lactone quorum-sensing molecules are modified and degraded by *Rhodococcus erythropolis* W2 by both amidolytic and novel oxidoreductase activities. *Microbiology.* **151**:3313-3322.

van Rhijn P, Vanderleyden J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**: 124-142.

- Vandeputte OM, Kiendrebeogo M, Rajaonson S, Diallo B, Mol A, El Jaziri M, Baucher M.** 2010. Identification of catechin as one of the flavonoids from *Combretum albiflorum* bark extract that reduces the production of quorum-sensing-controlled virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Appl. Environ. Microbiol. **76**:243-253.
- Vessey JK, Pawlowsky K, Bergman B.** 2004. Root-based N₂-fixing symbioses: Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. Plant Soil. **266**: 205-230.
- Vinardell JM, Ollero FJ, Hidalgo A, López-Baena FJ, Medina C, Ivanov-Vangelov K, Parada M, Madinabeitia N, Espuny M del R, Bellogín RA, Camacho M, Rodríguez-Navarro DN, Soria-Díaz ME, Gil-Serrano AM, Ruiz-Sainz JE.** 2004. NolR regulates diverse symbiotic signals of *Sinorhizobium fredii* HH103. Mol. Plant-Microbe Interact. **17**:676-685.
- Vincent JM.** 1970. En A manual for the practical study of root nodule bacteria. Blackwell Scientific Publication, Oxford (Reino Unido).
- Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM.** 2003. Root exudation and rhizosphere biology. Plant Physiol. **132**: 44-51.
- Weeks TE.** 1977. Differences between strains of *Rhizobium* sensitivity to canavanine. Plant Soil. **48**:387-395.
- White EW, Winans SC.** 2007 Cell-cell communication in the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*. Phil. Trans. R. Soc. B. **362**:1135-1148.
- Wilkinson A, Danino V, Wisniewski-Dye F, Lithgow, JK, Downie JA.** 2002. *N*-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorumsensing genes that regulate plasmid transfer. J.Bacteriol. **184**:4510-4519.
- Willems A.** 2006. The taxonomy of rhizobia: an overview. Plant Soil. **287**:3-14.

- Winzer K, Hardie KR, Williams P.** 2002. Bacterial cell to-cell communication: sorry, can't talk now-gone to lunch! *Curr. Opin. Microbiol.* **5**:216-222.
- Wisniewski-Dye F, Jones J, Chhabra, SR, Downie, JA.** 2002. *railR* genes are part of a quorum-sensing network controlled by cinI and cinR in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Bacteriol.* **184**:1597-1606.
- Yates EA, Philipp B, Buckley C, Atkinson S, Chhabra SR, Sockett RE, Goldner M, Dessaux Y, Cámara M, Smith H, Williams P.** 2002. *N*-acylhomoserine lactones undergo lactonolysis in a pH-, temperature-, and acyl chain length-dependent manner during growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* **70**:5635-5646.
- You M, Nishiguchi T, Saito A, Isawa T, Mitsui H, Minamisawa K.** 2005. Expression of the *nifH* gene of a *Herbaspirillum endophyte* in wild rice species: daily rhythm during the lightdark cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:8183–8190.
- Zhang HB, Wang C, Zhang LH.** 2004. The quormone degradation system of *Agrobacterium tumefaciens* is regulated by starvation signal and stress alarmone (p)ppGpp. *Mol. Microbiol.* **52**:1389-1401.
- Zhang HB, Wang LH, Zhang LH.** 2002. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:4638-46343.
- Zhang LH.** 2003. Quorum quenching and proactive host defense. *Trends Plant Sci.* **8**:238-244.
- Zhu J, Winans SC.** 2001. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signalling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:1507-1512.

Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand SK, Winans SC. 2000.
The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* **182**:3885-3895.